UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

DIACILGLICEROL:

REGULACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN EN LINFOCITOS

TESIS DOCTORAL

SILVIA CARRASCO GARCÍA

Madrid, 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

DIACILGLICEROL:

REGULACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN EN LINFOCITOS

TESIS DOCTORAL

SILVIA CARRASCO GARCÍA

Madrid, 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

DIACILGLICEROL:

REGULACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN EN LINFOCITOS

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada
por Silvia Carrasco García
para optar al título de Doctor
Madrid, Diciembre 2005

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección de la Dra. Isabel Mérida de San Román.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias al disfrute de una beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

A José Carrasco,
mi abuelo

Sólo se cree una teoría el científico que la ha concebido;
en cambio, menos el propio experimentador,
todos tienen fe en un resultado experimental.

Albert Einstein

A veces, el replanteamiento de un problema
es más decisivo que el hallazgo de la solución,
que puede ser un asunto de habilidad matemática o experimental.
La capacidad de suscitar nuevas cuestiones,
nuevas posibilidades de mirar viejos problemas,
requiere una imaginación creativa
y determina los avances científicos auténticos.

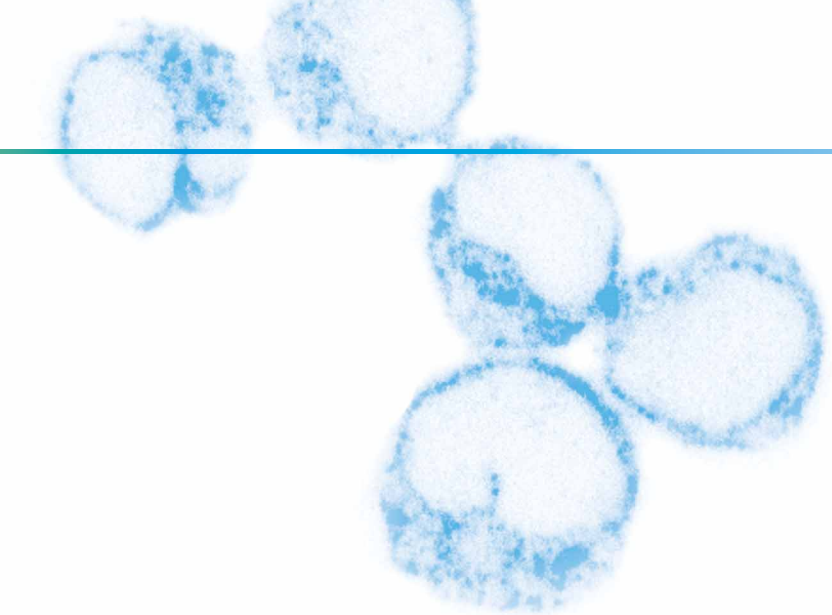
Albert Einstein

ÍNDICE

ABREVIATURAS

3AT	3-aminotriazol
ABL	Proteína de abelson
AICD	Muerte celular inducida por activación
ALK	Quinasa de linfomas anaplásticos
AMPc	Adenina-monofosfato cíclica
ANA	Anticuerpo anti-nuclear
AP-1	Proteína activadora-1
APC	Célula presentadora de antígeno
ARF	Factor de ribosilación de ADP
ARP	Proteína relacionada con actina
ATP	Adenina-trifosfato
BCR	Receptor de células B
BSA	Albúmina de suero bovino
C1-TEN	Fosfatasa que contiene un dominio C1 homóloga a tensina
CalDAG-GEF	GEF regulado por calcio y diacilglicerol
CaM	Calmodulina
CDP	Citidina-difosfato
CEPT1	Colina/etanolamina fosfotransferasa 1
CH	Dominio de homología a citrón
ConA	Conavalina A
CPT1	Colina fosfotransferasa 1
CRIK	Quinasa citrón
CTP	Citidina-trifosfato
DAG	Diacilglicerol
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DGK	Diacilglicerol quinasa
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DN	Timocitos dobles negativos ($CD4^-/CD8^-$)
DOC2	Proteína con doble dominio C2
DOG	1,2-dioleil-sn-glicerol
Dominio C1	Dominio conservado 1
Dominio C2	Dominio conservado 2
Dominio C3	Dominio conservado 3
Dominio C4	Dominio conservado 4
DP	Timocitos dobles positivos ($CD4^+/CD8^+$)
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
EGF	Factor de crecimiento epitelial
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FCS	Suero bovino fetal
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FRAP	"*Photorecovery after bleaching*"
GAP	Proteína activadora de GTPasas
GDI	Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina
GDP	Guanina-difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GFP	Proteína verde fluorescente
Gh	Proteína G monomérica h
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
Grb2	Proteína de unión al receptor de factor de crecimiento-2
GTP	Guanina-trifosfato
$G\alpha$	Monómero α de las proteínas G heterotriméricas
$G\beta\gamma$	Dímero $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas
H2b	Histona 2B
HA	Hemaglutinina
HBSS	Solución salina balanceada de Hepes
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL2	Interleuquina 2
IL3	Interleuquina 3
IL4	Interleuquina 4
IP	Inositol-fosfato
IP_3	Inositol-trifosfato
J	Curvatura
Jnk	Quinasa Janus
kDa	KiloDalton
Kidins220	Sustrato de 220 kDa que interacciona con PKD
KO	Ratón deficiente en...
Lck	Quinasa específica de linfocitos
LCMV	Virus de la CorioMeningitis Linfocítica
LCR	Región controladora de locus
Lfc	"*Lbc's First Cousin*"
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPAP	Fosfatasa de ácido lisofosfatídico
LPP	Fosfatasa de lípido-fosfato
LSP1	Proteína específica de linfocito 1
LT	Lisado total
MAG	Monoacilglicerol
MARCKS	Sustrato de quinasa C Miristoilado y Rico en Alanina
MEK	Quinasa de MAPK y ERK

MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MHD	Dominio de homología a Munc13
MLC	Cadena ligera de miosina
MRCK	Quinasa relacionada con miotonina que une Cdc42
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos
Munc13	"*uncoordinated 13*" de mamífero
NES	Señal de exporte nuclear
NF-E2	Factor nuclear E2
NFκB	Factor nuclear κB
NGF	Factor de crecimiento neuronal
Nir	Receptor que interacciona con el dominio N-terminal de Pyk2
NLS	Secuencia de localización nuclear
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
PA	Ácido fosfatídico
PAP	Fosfohidrolasa de ácido fosfatídico
PBD	Dominio de unión a p21
PBL	Linfocitos de sangre periférica
PC	Fosfatidilcolina
PC-PLC	Fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina
PC-PLD	Fosfolipasa D específica para fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	"*Pull down*"
PDB	"*Protein data bank*"
PDBu	Forbol 12,13-dibutirato
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDI	Proteína disulfuro-isomerasa
PDK	Quinasa dependiente de fosfoinosítidos
PDZ	Dominio presente en PSD-95 Discs-large y ZO-1
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehido
PH	Dominio de homología a pleckstrin
PHA	Fitohemaglutinina A
PI	Fosfatidilinositol
$PI(3,4)P_2$	Fosfatidilinositol-3,4-bifosfato
$PI(3,4,5)P_3$	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
$PI(4,5)P_2$	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PI4K	Fosfatidilinositol-4-quinasa
PI4P5K	Fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinasa
PICK	Proteína que interacciona con PKC
PIP_2	Fosfatidilinositol-bifosfato
PIP_3	Fosfatidilinositol-trifosfato
PIP5K	Fosfatidilinositol-fosfato-5-quinasa
PI-PLC	Fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PKCa	Proteína quinasa C atípica
PKCc	Proteína quinasa C clásica
PKCn	Proteína quinasa C nueva
PKD	Proteína quinasa D
PLA_2	Fosfolipasa A_2
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMA (TPA)	Forbol-12-miristato-13-acetato
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
POPE	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
POPI	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoinositol
POPS	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoserina
PS	Fosfatidilserina
PX	Dominio homólogo a Phox
RA	Dominio de asociación a Ras
RACK	Receptor para PKC activada
Raft	Balsa lipídica
Rag	Gen activador de la recombinación
RasGRP	Proteína liberadora de nucleótidos de guanina de Ras
Rb	Proteína de retinoblastoma
RBD	Dominio de unión a Ras
RBP	Proteína que une Ral
RD	Rodamina
RE	Retículo endoplásmico
REM	Motivo de intercambio de Ras
Rim	Molécula de interacción con Rab
Rin	Proteína que interfiere con Ras
RMN	Resonancia magnética nuclear
Rok (Rock)	Rho quinasa
RT-PCR	Retrotranscriptasa-reacción en cadena de la polimerasa
RVH	Dominio de homología a recoverina
SAG	1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicerol
SAM	Motivo alfa estéril
SB	"*Southern blot*"
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SEE	Enterotoxina de *Staphylococcus*, E
SH2	Dominio de homología a Src, 2
SH3	Dominio de homología a Src, 3
SM	Esfingomielina
SMS	Esfingomielina sintasa
SP	Timocitos simples positivos ($CD4^+/CD8^-$ o $CD4^-/CD8^+$)
SPP	Fosfatasa de esfingomielina-fosfato
STICK	Sustrato que interacciona con PKC
TAG	Triacilglicerol
TCR	Receptor de células T
TLC	Cromatografía en capa fina
Tmp21	Proteína transmembrana 21
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPA (PMA)	12-O-tetradeconoilforbol-13-acetato
TRPC	Canal receptor de potencial transiente
TSH	Tirotropina
UDP	Uracilo-difosfato
UTP	Uracilo-trifosfato
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
WB	"*Western blot*"
ζ	Curvatura espontánea



SUMMARY

Diacylglycerol (DAG) is a simple lipid with several functions in the cellular context. It is essential for more complex lipid synthesis, for the functionality of biological membranes and for signalling through specific DAG binding proteins thanks to the presence of a conserved 1 domain (C1 domain) in their sequences.

Considering its functional relevance, DAG levels must be strictly regulated to maintain cellular homeostasis. To gain this control, some enzymes, such as mammalian diacylglycerol kinases (DGK), have acquired new and more complex functions that allow them to be activated in response to extracellular stimuli. As a consequence, these enzymes can reduce elevated DAG levels and generate phosphatidic acid, another lipid that serves as a second messenger. Many studies have addressed the consequences of DGK activation. Nowadays, it is known that each of the 10 mammalian DGK isoforms can play distinct roles based on their expression, regulatory domains and mechanism of activation. Here we have investigated the effects derived of DGKα overexpression in two models where this particular isoform is relevant: cytoskeletal reorganization and lymphocyte proliferation. Our results indicate that DGKα, in endothelial cells, must be regulated to allow correct lamellipodium growing in response to PDGF. In lymphocytes, DGKα can modulate phosphatidylinositol-3-kinase activity to promote IL2 dependent proliferation.

DAG cellular levels are tightly controlled through the concerted actions of lipases, kinases and phosphatases. In order to establish the kinetics of DAG production and clearance we generated tools aimed to follow DAG in living cells. This type of approach could help us to better understand the regulation of DAG generation in lymphocytes, where this lipid level must be strictly regulated to maintain cell function. We used C1 domains present in the sequence of DAG-binding proteins expressed in lymphocytes as DAG biosensors. The selected sequences were fused to GFP and the resulting constructs, GFPC1aPKCθ, GFPC1bPKCθ, GFPC1a+C1bPKCθ, GFPC1β2Chimaerin and GFPC1RasGRP1, were used for time-lapse videomicroscopy studies. Our results demonstrate that, based on its folding, presence of specific residues and/or tandem combination, distinct C1 domain can discriminate between reservoirs and receptor-induced DAG pools. We have then taken advantage of these differences to analyze the kinetics and exact subcellular localization of DAG generation following TCR stimulation and to re-evaluate the importance of distinc pools of this lipid in DAG dependent Ras activation.

RasGRP1 is the main DAG-binding protein known to mediate Ras activation in T cells. Activation of RasGRP1 has been proposed to occur at the plasma and inner membranes based on its ability to bind DAG and to interact with actin cytoskeleton, respectively. Our data, showing a new mechanism of RasGRP1 activation and localization dependent on its interaction with Ras and DAG, allow us to propose a new role for its C1 domain in the maintenance of RasGRP1 active conformation, raising a new perspective of Ras-GTP generation in T cells.

INTRODUCCIÓN

El diacilglicerol (DAG) es un lípido sencillo constituido por una molécula de glicerol a la que se unen, por enlaces tipo éster, dos ácidos grasos en las posiciones 1 y 2 de la cadena. Este pequeño tamaño y sencilla composición confieren al DAG unas propiedades únicas que le permiten cambiar la estructura de las membranas de las que forma parte[95,96,118] y actuar como precursor de lípidos más complejos[506]. Además, en numerosas proteínas se ha desarrollado a lo largo de la evolución un dominio capaz de reconocer el DAG conocido como dominio conservado 1, domino C1[378], generando así una nueva función para el DAG en la señalización celular al participar en el reclutamiento y/o activación de diversas proteínas.

Al ser un componente básico de las membranas y un importante intermediario lipídico el DAG es esencial para el crecimiento y desarrollo de todos los tipos celulares y sus niveles han de estar estrictamente regulados para mantener la homeostasis celular. De esto se encargan proteínas como Nir2, un transportador de fosfatidilinositoles[83] que es capaz de controlar el ritmo de síntesis de fosfatidilcolina en función de su concentración en las membranas del Golgi y así regular el consumo de DAG, que es uno de los sustratos de la reacción[290]. En determinados tipos celulares, como los linfocitos, el DAG parece jugar un papel más especializado al participar también en los procesos de diferenciación y proliferación[151,211,450]. Esta nueva función es probablemente la consecuencia de la aparición en estas células de toda una batería de proteínas que controlan los niveles de DAG en función del estadio de desarrollo[362,555] y otras específicas que responden al DAG gracias a sus dominios C1.

Papel de Diacilglicerol en la Estructura y Dinámica de las Membranas Lipídicas

Las membranas biológicas están compuestas en su mayor parte por glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroles que, combinándose en distintas proporciones, confieren características específicas a las diferentes membranas celulares[452]. Estos lípidos, gracias a su carácter anfipático, forman bicapas lipídicas en las que la porción apolar se mantiene no expuesta al medio exterior mientras que las regiones polares permanecen en contacto con el medio acuoso. Esta distribución de los lípidos genera una estructura estable y elástica adaptable a las distintas necesidades celulares[506]. En función del tamaño de la región polar y apolar de un lípido, se considera que su contorno se adapta a una forma geométrica similar a un cono, invertido o no, o a un cilindro lo que provoca que la suma de estos lípidos genere membranas con distinta curvatura[429](J) (Fig.I1A). En este sentido se ha establecido el concepto de curvatura espontánea (ζ) que define en que sentido se curva una monocapa lipídica compuesta exclusivamente por un lípido en estudio. Así, si la monocapa se deforma hacia las cabezas polares se dice que la curvatura espontánea del lípido es positiva (forma de cono invertido), y si lo hace al contrario, es negativa (forma de cono). Si la monocapa no sufre ninguna alteración la curvatura espontánea del lípido que la forma es 0 (forma de cilindro) (Fig.I1A). Según el tipo de curvatura espontánea de cada lípido, éste se organizará en la membrana de distinta forma generando, estructuras lamelares si ζ=0, micelas si ζ>0 o micelas invertidas si ζ<0[429].

Aunque la curvatura espontánea de un lípido depende en gran medida de la longitud y grado de saturación de los ácidos grasos que lo componen[120,467] y del pH[260]

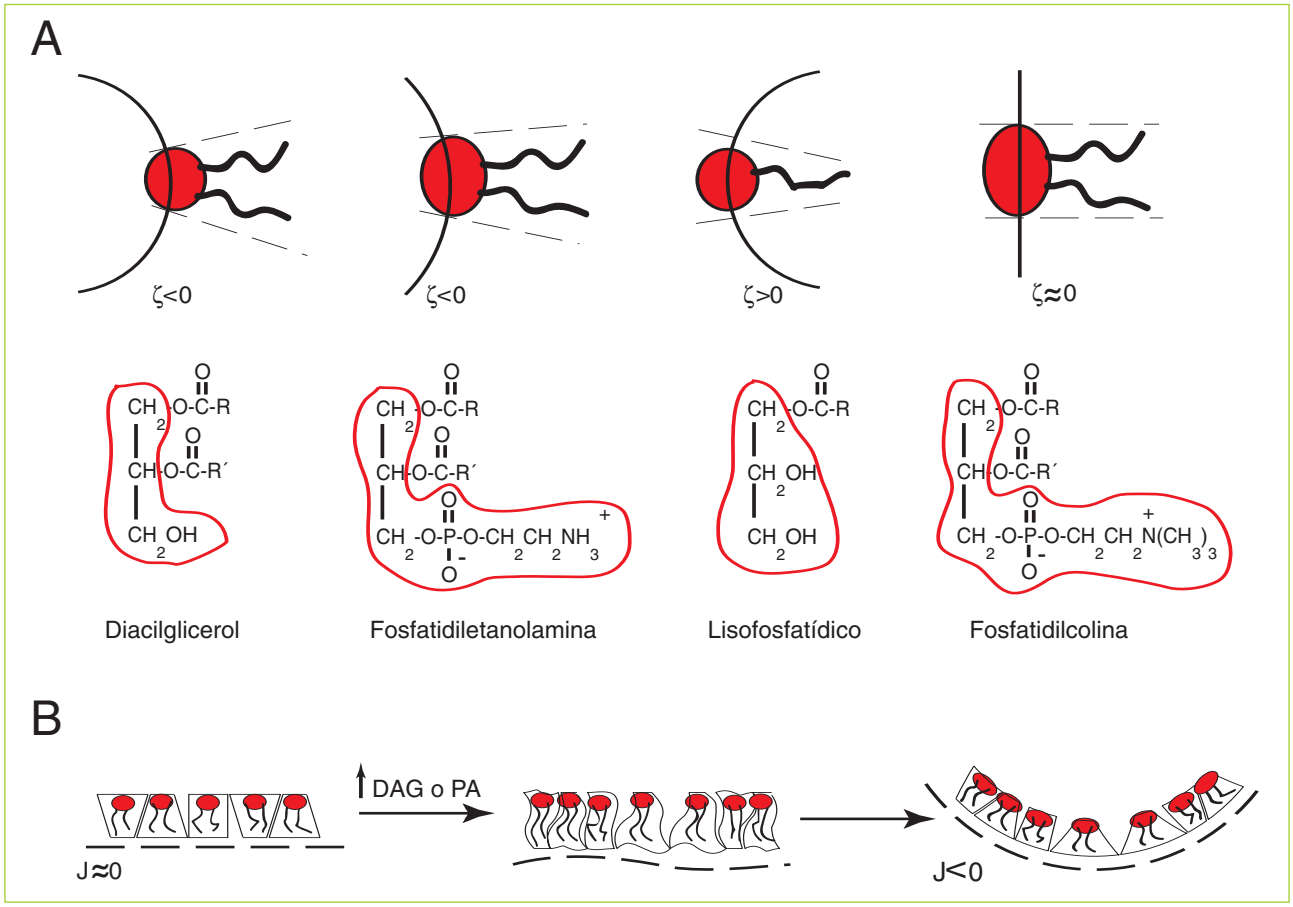


Figura I1 – Lípidos y curvatura

A – Se representan a modo de ejemplo cuatro lípidos con distinta curvatura espontánea (ζ). En rojo las cabezas polares que en función de su tamaño definirán el contorno del lípido (línea discontinua) y la curvatura de la membrana de la que forman parte (línea continua).

B – En una membrana convencional con una curvatura (J) próxima a 0 el incremento en diacilglicerol (DAG) o ácido fosfatídico (PA) genera una distorsión en la continuidad de la membrana que se resuelve con la aparición de un intermediario de elevada curvatura negativa.

y concentración de sales del medio de ensayo[261], se considera que el DAG tiene la curvatura espontánea más negativa descrita[429], ya que su cabeza polar, únicamente la cadena de glicerol, es muy pequeña en relación con la de los otros lípidos conocidos. En el extremo opuesto encontramos compuestos como el ácido lisofosfatídico (LPA) que al portar tan sólo un ácido graso tiene una curvatura espontánea positiva[260] (Fig.I1A).

La característica curvatura negativa del DAG provoca que aumentos de este lípido en regiones concretas de la membrana conduzcan a la inestabilidad y asimetría de la bicapa lipídica; para minimizar esta tensión generada, se formarán intermediarios con una elevada curvatura[429] (Fig.I1B) Estos intermediarios son esenciales en los procesos de fisión y fusión de membranas al favorecer la aparición de los estrechamientos de membrana, necesarios para la fisión, y las regiones inestables que permiten la fusión[57,274]. Las acumulaciones de DAG no sólo modificarán la estructura de la membrana, disminuyendo la energía necesaria en el proceso, sino que además, permitirán el anclaje de proteínas que son esenciales en la formación y tráfico de vesículas, como proteína quinasa D (PKD)[311] o ARF-GAP[15].

El DAG que participa en estos procesos se genera en su mayor parte a través de un intermediario, el ácido fosfatídico (PA), y la acción de unas enzimas, fosfohidrolasas de PA (PAP), que aparentemente están constitutivamente activadas lo que impide la acumulación evidente de PA en estos contextos celulares[340]. Existe cierta controversia respecto al papel que juegan el PA o el DAG en la formación de vesículas ya que el PA también tiene una curvatura espontánea negativa[260,261] y ambos lípidos han sido implicados en los procesos de formación de vesículas[29,37,181,231,246,345,404,407,423,437,521]. La diferencia fundamental entre estos lípidos es que el DAG, al no tener carga, se desplaza con mayor facilidad tanto a lo largo como a través de la bicapa lipídica[27] lo que, según algunos autores, es esencial para su función[429]. El PA, en cambio, se mantiene formando pequeños complejos estabilizados por enlaces de hidrógeno que permiten generar regiones de monocapa esenciales, según otros autores, para la formación de la vesícula[261]. Además, la curvatura espontánea del PA es muy dependiente del pH lo que provoca que sólo a pH ácido tenga capacidad de generar estructuras no lamelares limitando su acción a contextos celulares muy concretos[261].

La capacidad del DAG de alterar la estructura de las membranas lipídicas de forma puntual también afecta a la actividad de ciertas proteínas que realizan su función en las proximidades de la membrana como fosfolipasa C (PLC)[184,505], fosfolipasa A_2[56,264], proteína quinasa C (PKC)[119,445], CTP:fosfocolina citidiltransferasa[17,20,443], ARF-GAP[15] o proteínas del coatómero[265]. Este efecto se debe a que al distorsionarse la membrana por la acumulación de DAG se generan pequeñas zonas donde las regiones apolares de la bicapa se exponen mejorando las interacciones hidrofóbicas de las proteínas con la membrana[156]. También se ha descrito la capacidad del DAG de activar canales de Ca^{2+} como los TRPC[8,185,299,357,476], que se encargan de la entrada capacitativa de Ca^{2+}, u otros que se abren en respuesta a la estimulación del TCR[70]. Esta activación no es dependiente de proteínas reguladas por DAG por lo que el efecto podría deberse a la modificación de la membrana plasmática al igual que ha sido descrito para las bombas de Ca^{2+}, Ca^{2+}ATPasas, del retículo sarcoplásmico[73].

DIACILGLICEROL, UNA PIEZA CLAVE EN EL METABOLISMO LIPÍDICO

El DAG tiene un papel fundamental en la síntesis y degradación de lípidos para el mantenimiento de la homeostasis durante el crecimiento y desarrollo celular. Además, determinadas cascadas de señalización pueden modular la cantidad de DAG en contextos celulares definidos regulando así otros proteínas efectoras que darán lugar a una respuesta específica en la célula.

1 SÍNTESIS de novo DE DIACILGLICEROL

En levaduras y mamíferos existen dos rutas de síntesis de DAG (revisado en 19), una a partir de glicerol-3-fosfato (resultado de la movilización de triacilgliceroles) y otra a partir de dihidroxiacetona-fosfato (intermediario de la glucólisis). Estos dos precursores sufrirán entre otras modificaciones dos acilaciones dando lugar en primer lugar a LPA y posteriormente a PA que será trasformado en DAG por la acción de PAP[340] (Fig.I2).

La primera acilación de la ruta de glicerol-3-fosfato se lleva a cabo en la membrana externa de la mitocondria y en el retículo endoplásmico (RE) mientras que en el caso de la vía de dihidroxiacetona-fosfato se produce o bien en el RE o en la cara expuesta al lumen de la membrana del peroxisoma. El papel del peroxisoma y la mitocondria no es muy significativo ya que el 90% de las acilaciones en la posición 1 de la cadena de glicerol se produce en el RE, aunque sí parece que en cada localización subcelular se añaden distintos tipos de ácidos grasos: en la mitocondria y en el peroxisoma, sólo saturados y en el RE tanto saturados como insaturados.

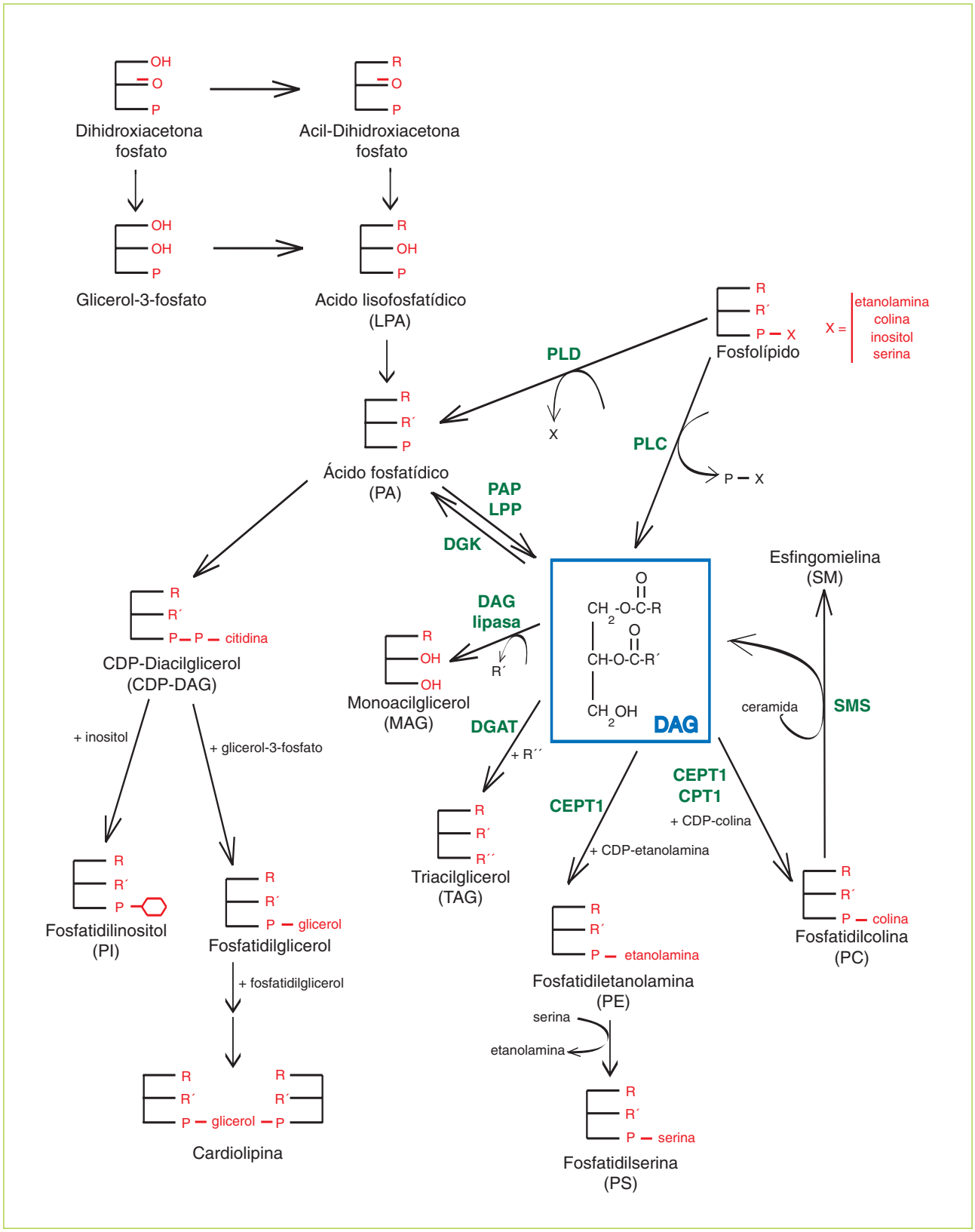


Figura I2 – Principales rutas implicadas en la síntesis y degradación de diacilglicerol
Se indican en verde las enzimas directamente implicadas en la producción o transformación de diacilglicerol (enmarcado en azul). En rojo se muestran los grupos que sufren transformaciones a lo largo de las distintas reacciones y en negro la cadena de 3 carbonos invariable.

En cuanto a la segunda acilación, aunque puede tener lugar en el peroxisoma, se produce fundamentalmente en la membrana del RE donde se localizan dos proteínas transmembrana con actividad aciltransferasa. Estas enzimas presentan su región catalítica hacia el citosol de la célula y aunque catalizan la misma reacción tienen distinta especificidad por los ácidos grasos que incorporan al LPA. La localización subcelular donde se haya realizado la primera acilación junto con la especificidad de estas proteínas del RE va a permitir generar PA con distinta composición de ácidos grasos, aunque ésta podrá ir cambiando posteriormente gracias a la acción de aciltransferasas y desaturasas[540].

Una vez generado el PA las fosfatasas de ácido fosfatídico (PAP), son las enzimas encargadas de transformarlo en DAG. En un principio se describieron dos tipo de fosfatas por sus diferencias en cuanto a actividad enzimática y localización subcelular (revisado en 48, 340, 426):

- **PAP1**: Requiere Mg^{2+} para la catálisis, es inhibible por N-etilmaleimida y localiza en citosol desde donde transloca a membranas internas, como la del RE, en respuesta a la acumulación de ácidos grasos, PA o ésteres de ácidos grasos con coenzimaA. Su sustrato es únicamente PA.

- **PAP2**: No requiere Mg^{2+} para la catálisis, no se inhibe por N-etilmaleimida y localiza en la membrana plasmática. Sus sustratos son numerosos: PA, LPA, esfingosina-1-fosfato, colina-1-fosfato y otros.

Un estudio más detallado ha permitido concluir que la actividad enzimática de PAP2 en realidad la lleva a cabo una familia de enzimas con especificidad por distintos lípidos. Por esta razón ahora se conoce a estas enzimas como fosfatasas de lípidos-fosfato **(LPP)** y se ha determinado que también pueden localizar en membranas internas como RE y aparato de Golgi en función de su estado de glicosilación. Hasta el momento se han caracterizado varios miembros de la familia: LPP1, LPP2, LPP3, LPP4 o SPP1 (fosfatasa de esfingosina-1-fosfato) y LPAP (fosfatasa de LPA); sólo LPP1 y LPP3 parecen usar PA como sustrato. Sin embargo, la actividad PAP (antiguamente PAP1) no ha podido ser clonada por lo que la herramienta que se utiliza generalmente para su estudio es un inhibidor, propranolol, que actúa principalmente sobre PAP y no sobre LPP[217,396].

Las enzimas LPP son proteínas de 6 dominios transmembrana que presentan su centro catalítico hacia el exterior celular lo que les permite tener ecto-actividad sobre lípidos que localizan fuera de la célula. Esta actividad se ha podido comprobar en *Drosophila melanogaster* organismo en el que *wunen* y *wunen2*[173,551,552], los ortólogos de las LPP de mamíferos, son esenciales para la correcta migración de las células germinales a través del mesodermo por su capacidad de modificar el entorno migratorio.

Esta actividad fosfatasa es un ejemplo de la convergencia entre los mecanismos implicados en la señalización y la homeostasis celular ya que en ambos procesos es necesaria esta actividad. En la biosíntesis de fosfolípidos, esencial para el crecimiento celular, participará activamente PAP y en la señalización miembros de los dos grupos, tanto PAP como LPP que combinarán su acción con la de fosfolipasa D (PLD) para generar DAG[425]. En este sentido se ha podido determinar el aumento de actividad fosfatasa en respuesta a distintos estímulos celulares[222,226,487].

Otro ejemplo que confirma la conexión existente entre el metabolismo y la señalización es una de las enzimas encargadas de la síntesis de LPA, concretamente la forma β, que es un marcador de pronóstico en cáncer de ovario. Su inhibición reduce el desarrollo de cáncer de ovario en ratones no por la bajada de LPA, otro segundo mensajero lipídico, sino por el bloqueo de la síntesis de PA y consecuentemente de DAG que provoca un descenso en la activación de alguno de sus proteínas efectoras como RasGRP2 o PKCα[451].

2 OTRAS VÍAS DE SÍNTESIS DE DIACILGLICEROL

Además de la síntesis de novo en la célula se puede obtener DAG a partir de otras tres vías: actividad esfingomielina sintasa, fosfolipasa C y fosfolipasa D. En estos dos últimos casos la generación de DAG parece ser dependiente de un estímulo externo y no de la dinámica convencional del metabolismo. Aún así, las incluimos en esta sección por su capacidad de generar DAG, aunque éste generalmente no se desvía hacia las rutas metabólicas[346].

A) Actividad esfingomielina sintasa (SMS).

La actividad SMS es la encargada de la síntesis de esfingomielina (SM) a partir de PC, intercambiando la molécula de glicerol por una de ceramida y liberando así DAG (Fig.I2).

Aunque esta actividad se conoce desde hace tiempo la única herramienta de estudio que existía era un inhibidor farmacológico, D-609[298], hasta que en el año 2004 se clonaron dos enzimas, SMS1 y SMS2, que se encargan de la síntesis de SM a partir de PC en el lumen del aparato de Golgi (SMS1) y en la membrana plasmática (SMS2)[195]. Los primeros estudios realizados con SMS1 han relacionado su actividad con la señalización de Fas[332].

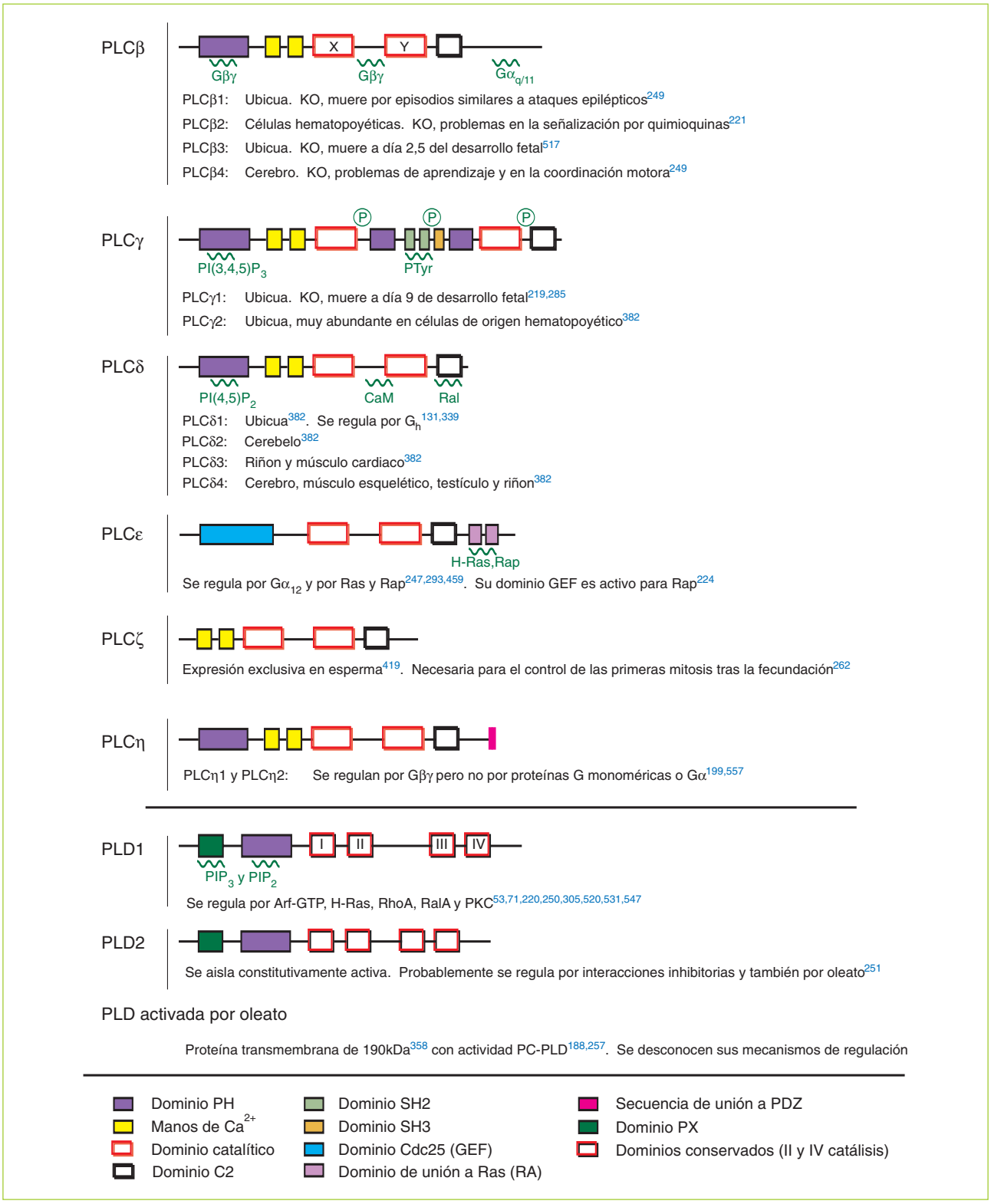


Figura I3 – Principales dominios de las enzimas fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa D (PLD) y mecanismos de regulación
Se representan de forma esquematizada los dominios presentes en las formas más completas de cada uno de los grupos. En verde los elementos implicados en la regulación, ya sea la interacción con otras proteínas o lípidos, indicando la zona de contacto mediante una espiral, o la fosforilación (P). Referencias relevantes en cuanto a la regulación, PLCβ: 366, 441, 471, PLCγ: 127, 382, PLCδ: 11, 149, 438, PLCε: 224, 247, 449, PLCζ: 262, 267, PLD1: 271, 287, 454.

B) Actividad fosfolipasa C (PLC).

Las enzimas con actividad PLC son capaces de generar DAG a partir de la hidrólisis de glicerofosfolípidos liberando el grupo polar fosforilado (Fig.I2). Aunque se conoce la existencia de actividad PLC capaz de hidrolizar fosfatidilcolina (PC), PC-PLC[126], la más estudiada es la específica para fosfatidilinositol (PI), PI-PLC. En la actualidad se han clonado hasta 14 genes que codifican por distintas PI-PLC que se han agrupado en seis categorías en función de su homología de secuencia y de su mecanismo de activación (Fig.I3). La característica común a todas las PI-PLC (revisado en 382) es su dominio catalítico dividido en dos regiones conocidas como caja X y caja Y. En estas cajas se localizan los residuos conservados necesarios para la catálisis, que se encargarán, entre otros aspectos, de la coordinación de un ión de Ca^{2+} y de la correcta ubicación del anillo de inositol que participará en el ataque nucleofílico sobre el fósforo. El dominio conservado 2, dominio C2, presente en todos los miembros de la familia PI-PLC, puede unir Ca^{2+} y fosfatidilserina (PS) y es necesario para la correcta disposición de la proteína en la membrana.

Las enzimas PI-PLC son una pieza clave de los mecanismos de transducción de señales ya que además de producir DAG generan IP_3 que es esencial para permitir la salida de Ca^{2+} del RE. La combinación de estos dos segundos mensajeros va a permitir regular numerosas cascadas de señalización lo que ha situado a las PI-PLC como elementos esenciales en procesos como la proliferación, diferenciación, activación o migración celular, entre otros (revisado en 382).

C) Actividad fosfolipasa D (PLD)

Combinando la acción de PLD con la de PAP o LPP se puede obtener DAG a partir de glicerofosfolípidos (Fig.I2). Aunque el principal sustrato de la actividad PLD es PC (PC-PLD) también se ha descrito actividad PLD capaz de hidrolizar PI[74], fosfatidiletanolamina[310] (PE) e incluso el glicosilfosfatidilinositol (GPI) que ancla a algunas proteínas a la membrana[160]. Hasta el momento se han clonado dos proteínas con actividad PC-PLD en mamíferos: PC-PLD1[169] y PC-PLD2[85], aunque se ha podido purificar otra enzima, de mayor peso molecular y cuya actividad depende de la presencia de oleato, que aún no ha sido caracterizada a nivel molecular[358] (FigI3). El DAG que se produce como resultado de la actividad de estas enzimas presenta distinta composición en términos de ácidos grasos en comparación con el obtenido a partir de PI-PLC ya que el PI presenta habitualmente en la posición 1 de la cadena de glicerol ácido esteárico (18:0) y en la 2 araquidónico (20:4) y PC está formado principalmente por ácidos grasos saturados o monoinsaturados en su posición 2[183,509].

La actividad PC-PLD (revisado en 84, 288) ha sido vinculada principalmente con los mecanismos de tráfico vesicular[84] aunque en los últimos años se ha descrito su papel en el control del crecimiento y la proliferación celular[139] ya que entre sus efectores se encuentran proteínas como Raf[154] o mTOR[72]. No se han descrito inhibidores farmacológicos para este grupo de enzimas pero se suele utilizar, para bloquear sus efectos, su capacidad de transfosfatidilación que le permite, en presencia de alcoholes primarios, en vez de generar PA producir fosfatidilalcoholes que no tienen efecto en la célula[441].

3 USOS DE DIACILGLICEROL EN EL METABOLISMO LIPÍDICO

A) Síntesis de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina.

Una vez que se ha obtenido DAG una de la rutas que puede seguir es la síntesis de PE y PC. Ambos lípidos se producen por la adición sobre el DAG de etanolamina y colina previamente activados por la unión a CTP generando CDP-etanolamina o CDP-colina (Fig.I2).

En mamíferos hay dos enzimas capaces de catalizar la incorporación de los alcoholes activados al DAG; son colina/etanolamina fosfotransferasa (CEPT1) y colina fosfotransferasa (CPT1), la primera está implicada en la síntesis de PC y PE y la segunda participa sólo en la de PC[178]. CEPT1 localiza tanto en RE como en la membrana externa del núcleo mientras que CPT1 es exclusiva del aparato de Golgi. Ambas proteínas presentan varias regiones transmembrana manteniendo la región catalítica expuesta en la cara citosólica.

La síntesis de PS se produce a partir de PE por la acción de una transferasa que cambia el grupo etanolamina por serina. Esta reacción tiene lugar en el RE o en el aparato de Golgi[506] (Fig.I2).

B) Síntesis de triacilglicerol y monoacilglicerol

Otro de los posibles destinos del DAG es su transformación en triacilglicerol (TAG) por la esterificación de un nuevo ácido graso en la única posición libre de la cadena de glicerol, la 3 (Fig.I2). De esto se encarga la actividad diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) que se localiza en el RE[200]. El TAG es la principal forma de almacenamiento de energía y por la acción de lipasas, se convierte en una fuente de moléculas de DAG para la síntesis de lípidos más complejos.

El DAG también puede ser sustrato de diacilglicerol lipasas que normalmente se encargan de retirar el ácido graso en posición 2 dando lugar a monoacilglicerol (MAG) (Fig.I2). En plaquetas, en respuesta a trombina, la actividad

	Clonaje	Isoformas	Expresión	Localización subcelular	Regulación	Funciones descritas
GRUPO I				Dominio catalítico; Dominio C1; Manos de Ca^{2+}; Dominio homólogo a recoverina		
α	1990, cerdo # X53256[409] Aa: 734 Peso: 82kDa		Timo (DN no[362]) Linfocitos T[535] Oligodendrocitos Riñón[409] Endotelio[94] Mús. liso[111] Se reprime en células T activadas[417]. Se induce en anergia[308] y en diferenciación HL60[31,538].	Proteína citosólica[535] y nuclear[137]. Según estimulación transloca a: - **Membrana plasmática**: TCR, carbacol[416,417], D-α-tocoferol[148] y ATP[435]. - **Región perinuclear**: IL2[137] y ácido araquidónico[435]. - **Matriz nuclear**: tratamiento de 4h con ConA[508]. - **Red del trans-Golgi y vesículas CD63**+: AICD inducida por estimulación con carbacol (10-15h)[12].	- **Ca^{2+}**: aumenta actividad y colabora en la translocación[409,410,416,537]. - **Fosforilación en Ser por PKC o PKA**: estabiliza la forma asociada a membrana[235,236]. - **Fosforilación en Tyr**: EGF[421] y HGF[94] y D-α–tocoferol[148] (mediadas por Src). Necesaria para la translocación en respuesta a TCR[416]. - **PS**[1,128] **y esfingosina**[536]: cooperan con Ca^{2+}. - **EGF**[111], **IL2**[137], **PDGF**[111], **FGFb**[111], **HGF**[94], **VEGF**[28]: aumentan actividad. - **Actividad PI3K**: modula la actividad y la localización subcelular[80].	- Proliferación inducida por IL2[137] o IL4[138] y en linfomas tipo ALK[26]. - Migración celular inducida por HGF[94] o VEGF[28]. - Regula la activación patológica de PKC en células endoteliales en modelos de diabetes[111,270,502]. - Modula la activación de la vía de Ras en respuesta a la estimulación con carbacol o del TCR[229,416,417]. - Supervivencia de $CD4^{+}CD8^{+}$ en timo[362]. - Secreción de exosomas letales (AICD)[12].
β	1993, rata # D16100[158] Aa: 801 Peso: 90kDa	Por estudios "in silico" se detectan 16 isoformas[68]. Se confirman 8 por RT-PCR, 5 de ellas con 35 aa menos en el C-terminal, 87kDa	Cerebro: neuronas[158] Glándula adrenal Intestino delgado	Proteína en membrana plasmática. Por deprivación de suero relocaliza a citosol y puede entonces translocar en respuesta a PMA[68]. La forma más corta es activa y citosólica. No transloca en respuesta a PMA[68].	- **Ca^{2+}**: aumenta actividad[158]. - **PDBu**: su dominio C1a es capaz de unir PDBu, aunque no se detecta unión de la proteína completa[434]. - **PI(4,5)P_2**: aumenta actividad[80].	- La forma más corta se expresa en pacientes con determinados desórdenes de comportamiento. # AF019352[68]
γ	1994, humano # D26135[233] Aa: 791 Peso: 89kDa	Otra isoforma con una delección en la región catalítica. Sin actividad. # D26135[233]	Retina, cerebro: cerebelo[537]. Se reprime en diferenciación de HL-60[538].	Proteína citosólica y asociada a la fracción de citoesqueleto[159]. Colocaliza con F-actina[489]. Transloca a membrana plasmática (estímulo: ATP o araquidónico[435]).	- **Ca^{2+}**: no regula la actividad[159,233]. - **PS**: aumenta la actividad[233]. - **PDBu**: su dominio C1a es capaz de unir PDBu y también la proteína completa[432,434,435].	-Diferenciación de HL-60 a macrófagos[538]. - Modula la translocación de PKCγ[435]. - Su actividad disminuye la carga de GTP de Rac, en respuesta a PDGF, afectando la generación de lamelipodios[489].
GRUPO II				Dominio catalítico; Dominio C1; Dominio PH; Dominio SAM; Región rica en Ser y Glu; Dominio coiled-coil		
δ	1996, humano # D73409[411] Aa: 1169 Peso: 130kDa	Isoforma II: 52 aa más en el extremo N-terminal: región rica en Pro y otra en Glu y Asp # AB078966[414] Es más abundante que la I.	Mús. esquelético Próstata[411] Testículo Leucocitos Colon Regulable por TPA y EGF[414]	Proteína citosólica y asociada al citoesqueleto y a la fracción microsomal: localización parcial en RE mediada por el dominio SAM[338]. Transloca a membrana plasmática en respuesta a TPA dependiendo del dominio PH y de PKC. La isoforma II no[205].	- **Oligomerización**: forma dímeros o tetrámeros. Es necesario el dominio SAM. Se forman homo- y hetero-oligómeros (I/II o δ/η). En presencia de PMA sólo se detectan monómeros[205,414]. - **Fosforilación**: mediada por cPKC en el dominio PH. Regula la localización subcelular[414,205,206].	- Control del transporte entre los compartimentos de Golgi y RE tanto anterogrado como retrogrado. No depende de actividad pero sí del dominio PH y de la localización a Golgi por el dominio SAM[338].
η	1996, hamster # U59429[254] Aa: 1154 Peso: 127kDa	Isoforma II: 1220 aa. Dominio SAM y posible sitio de unión para dominios PDZ tipo I en el C-terminal. # AB078968[337]	I: ubicua. II: riñón, colon, testículo. I se induce por glucocorticoides y II se reprime[337]	Ambas isoformas son citósolicas y translocan a endosomas en respueta a estrés oxidativo o choque osmótico[337].	- **Oligomerización**: forma dímeros o tetrámeros. Es necesario el dominio SAM. Se forman homo- y hetero-oligómeros (δ/η). La isoforma II regula su actividad en función de su estado de oligomerización[337]. - **Fosforilación inducida por TPA**: la isoforma I sí y la II no[337].	
κ	2005, humano. # AB183864. Aa: 1271. Peso: 142kDa[207]. Testículo, placenta y bazo. Localización en membrana plasmática dependiente de 100 aa del extremo C-terminal. No contiene dominio SAM pero sí secuencia de unión a PDZ (C-terminal) y 33 repeticiones Glu-Pro-Ala-Pro (N-terminal). Se fosforila por Src en respuesta a estrés oxidativo.					

GRUPO III				Dominio catalítico Dominio C1		
ε	1996, humano # U49379[474] Aa: 567 Peso: 64KDa		Ubicua. Mayor expresión en testículo, cerebro y retina[259,474].	Aparece tanto en fracción soluble como insoluble[474].	- **1-estearoil-2-araquidonoil**: tiene especificidad por este sustrato[371,474]. - **Ca^{2+}**: aumenta la actividad[477].	- **KO**: cambios en la susceptibilidad a ataques electrocompulsivos y en el potencial de larga duración en neuronas del hipocampo[300,398].
GRUPO IV				Dominio catalítico Dominio C1 Dominio MARCKS (NLS) Repeticiones de anquirina Secuencia de unión a PDZ		
ζ	1996, humano # U51477[55] Aa: 928 Peso: 104KDa	Otra isoforma con expresión en músculo, timo, bazo y nódulos linfáticos. Tiene distinto el extremo N-terminal: 130KDa. # U94905[104] Por WB aparece otra banda que podría ser otra forma de procesamiento[291,555].	Ubicua[55]. Su expresión se modula: En procesos de isquemia[10]. En respuesta a endotelina[470]. En el hipotálamo, en función de la ingesta de grasa y del peso del animal en estudio[291].	Diferente según el tipo celular: - **Citosol a núcleo**: localización regulada por fosforilación por PKC en el NLS[482]. - **Citosol a membrana plasmática**. En respuesta a carbacol: es necesaria la presencia de los dominios C1 y la fosforilación en Ser del dominio MARCKS[418]. En respuesta a TCR[556] y suero[25]. En respueta a GnRH dependiendo del citoesqueleto y de la presencia de c-Src[98]. En células sobre fibronectina[484]. - **Núcleo a región perinuclear**: diferenciación neuronal[191] y procesos de isquemia en el cerebro[10].	- **Receptor de leptina**: La proteína interacciona con el receptor largo de leptina a través de las repeticiones de anquirina[291]. - **Fosforilación por PKC (PKCα)**: En Ser del dominio MARCKS. Modula la actividad y probablemente colabora en definir la localización subcelular (Ser del NLS)[482] y la interacción con otras proteínas como PKCα[534]. - **Fosforilación por ERK**: en el extremo C-terminal antes de las repeticiones de anquirina y regula la distribución entre citoesqueleto y citosol[3,25]. - **Interacción con sintrofinas**: se produce a través del dominio PDZ y define la localización subcelular de ambas proteínas[186] y de otras asociadas como actina, distrofina[3] o Rac que se une a DGK a través de sus dominios C1[534]. - **Estimulación con GnRH[98] y modelo de hipoxia ($CoCl_2$)**[25]: aumenta la actividad. - **Interacción con pRb**: a través del dominio MARCKS. Aumenta su actividad[297].	- Control de la progresión de ciclo celular[482] - Su actividad regula la vía de activación de Ras en células J14[555] y Jurkat[484]. Interacción con RasGRP1 a través de la región C-terminal del dominio catalítico[484]. - **KO**: ligero descenso del número de células T maduras. Aumenta la señalización de la vía de Ras en timocitos y linfocitos T y el número de divisiones celulares en respuesta a CD3. En ratones $Rag2^{-/-}$, reconstituidos con células del KO, hay más células T que en el control. Mejor respuesta a la infección por LCMV[556]. - Se asocia con PIP5KIα[303] (complejo con RhoGDI)[228,480] y PKCα[301,302] y regula sus actividades. - Control de la hipertrofia de cardiomiocitos inducida por endotelina-I[470]. - Control de la actividad de mTOR medida como fosforilación de p70S6K[25]. - Diferenciación de neuronas[534].
ι	1998, humano # AF061936[105] Aa: 1065 Peso: 130KDa	II: sin dominios de anquirina. # AB058963[213] III: sin dominios de anquirina y sin parte de la región catalítica. # AB058964[213]	Cerebro Retina[105] Placenta y ovario Las isoformas I y III son las más abundantes[213].	Tanto en fracción soluble como particulada[105]. La isoforma I se detecta en núcleo y cuando se sobreexpresan PKCα, β o γ pierde esta localización[105].		- **KO**: en los fibroblastos inmortalizados disminuye la actividad de Elk1 tanto en respuesta a suero como a PDGF[384]. DGK interacciona con RasGRP3 y disminuye su capacidad de cargar Rap lo que correlaciona con una subida en la activación de los efectores de la vía de Ras (modelo in vivo de generación de tumores).
GRUPO V				Dominio catalítico Dominio C1 Dominio PH Dominio de unión a Ras Región rica en Pro y Gly		
θ	1997, humano # L38707[189] Aa: 942 Peso: 110KDa		Cerebro[189] Mús. liso Endotelio[513]	Asociada a la periferia celular: membrana y citoesqueleto[190]. En núcleo se acumula en speckles, gránulos de intercromatina y fibras pericromatínicas[468], dependiendo de la fase de la división[493]. En células epiteliales transloca a membrana plasmática en respuesta a DAG. Son necesarios sus dominios C1, que no unen TPA, y es independiente de actividad PKC[491].	- **Unión a Rho-GTP**: la interacción en la región catalítica provoca su inactivación[190,296]. - **Noradrenalina**: activación dependiente de PI3K. Translocación a Golgi y m. plasmática[513]. - **Trombina**: activación y translocación a núcleo[47]. - **NGF**: activación de la fracción nuclear y su translocación a la matriz nuclear[469]. - **Fosforilación por PKCε**: modula la translocación a membrana plasmática en células epiteliales (estímulos: bradiquinina, ATP, UTP, UDP)[491].	

Tabla I1 – Diacilglicerol quinasas (DGK)

combinada de PI-PLC y DAG-lipasa permitirá liberar ácido araquidónico que se utiliza como sustrato para la síntesis de tromboxanos y prostaglandinas[33].

C) Síntesis de ácido fosfatídico (PA)

A partir de DAG gracias a la actividad diacilglicerol quinasa (DGK) se puede obtener PA (Fig.I2). Este PA es esencial en la producción de PI y cardiolipina[506]. Aunque se conoce que el DAG se puede desviar hacia esta ruta[415] hasta el momento ninguna de las 10 DGK clonadas en mamíferos parece encargarse de este paso metabólico.

Todas las DGK comparten una región catalítica y se agrupan en cinco categorías en función de los dominios reguladores que presentan en su secuencia primaria (Tabla I1). Aunque la región catalítica está bien limitada en todos los miembros de la familia la necesidad de otros dominios para llevar a cabo la catálisis depende de la DGK en estudio. En este sentido, todas ellas presentan al menos dos dominios C1 que en algunos casos parecen ser esenciales para la actividad de la enzima como en DGKγ[435] o DGKζ[418] y en otros no como DGKα[412]. Sí es importante destacar que todos los dominios C1 de las DGK próximos a la región catalítica presentan una secuencia que se conoce como extensión del C1 que está altamente conservada y podría jugar un papel primordial en la catálisis[296]. En la tabla I1 se resumen las principales características de los 10 miembros de esta familia que han sido activamente implicados en numerosas vías de señalización celular (revisado en 237,239,304,413,483,492,493).

Diacilglicerol, un Segundo Mensajero Lipídico

Desde los años 80 que se describió a las PKC como el principal efector del DAG en la célula[172,248,428], se han descrito numerosas proteínas que se activan gracias al DAG, por la interacción directa de éste con el dominio C1 presente en su secuencia primaria (revisado en 51,168,234, 243,244,245,450,542).

1 Dominio C1: Estructura y Características Principales

Los dominios C1 se describieron en los años 80 como los dominios capaces de unir ésteres de forbol como PMA o PDBu[58,360] y posteriormente se demostró su capacidad de unir también DAG[378] y otros compuestos relacionados como briostatinas, indolactanos o merezeínas.

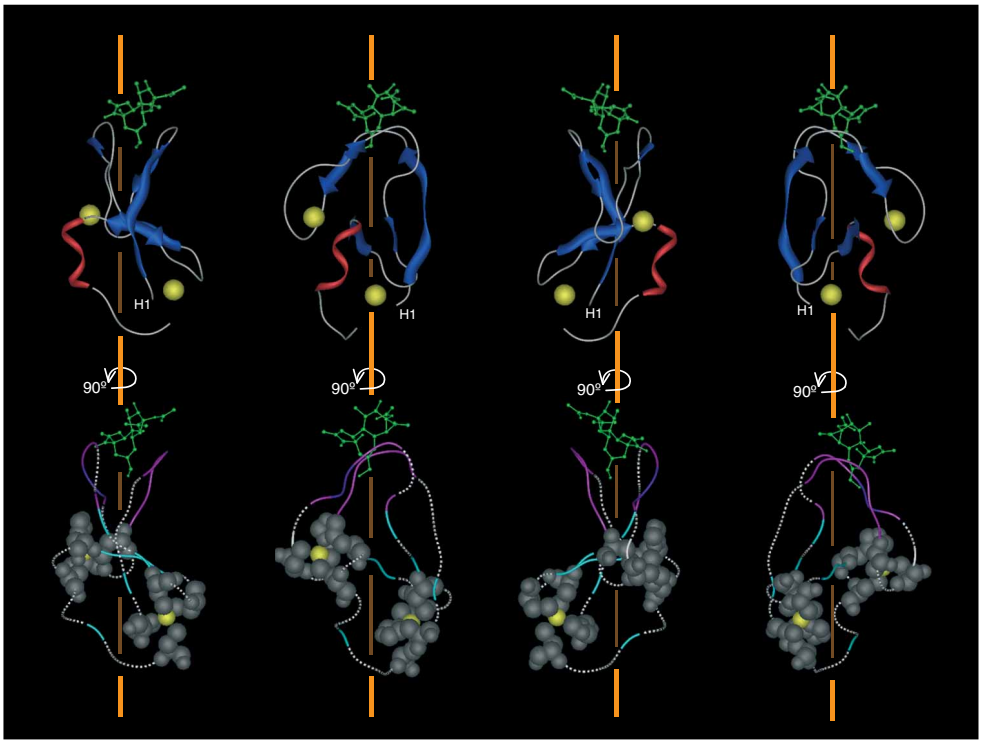
El dominio C1 está constituido por aproximadamente 50 residuos que se ajustan a una secuencia consenso establecida: $HX_{11-12}CX_2CX_{12-14}CX_2CX_4HX_2CX_{6-7}C$ (H, histidina, C, cisteína, X, cualquier aminoácido)[194]. En su estructura secundaria, presenta 5 conformaciones β (en azul en la Fig.I4), que formarán 2 láminas β antiparalelas, y una hélice α (en rojo en la Fig.I4)[187,532,550]. Los residuos de cisteína y de histidina (en gris en la Fig.I4) forman en la estructura terciaria dos cavidades donde se coordinan dos átomos de Zn^{2+}. Cada una de estas cavidades está formada por 3 cisteínas y 1 histidina no consecutivas en la estructura primaria, que mantienen sus posiciones en el espacio con la colaboración de otros residuos del dominio C1 que también están altamente conservados y son hidrofóbicos: Phe3, Leu21, Trp22, Met36, Val38 y Val46[187,198] (en rosa en la Fig.I4). Además, las posiciones 28, 30 y 37 (en azul en la Fig.I4) son esenciales en el mantenimiento de las estructuras secundarias[198].

La coordinación de los átomos de Zn^{2+} permite generar una base muy estable que interaccionará con la membrana y que sirve de soporte para los dos bucles, más flexibles, que constituyen las paredes del surco donde se produce la interacción con el DAG o los ésteres de forbol[550] (Fig.I4). Esta interacción mediada por puentes de hidrógeno provoca el desplazamiento de las moléculas de agua de esta posición permitiendo una mayor penetración de toda la estructura en la membrana[550].

El estudio de los residuos implicados en la interacción con los ésteres de forbol[242,379,550] (en rosa en la Fig.I4) ha permitido establecer dos categorías de dominios C1 en función de si éstos están conservados, dominio C1 típico, o no, domino C1 atípico[198]. La función de los dominios C1 atípicos aún no ha sido esclarecida aunque algunos estudios indican que podrían ser esenciales para la interacción con otras proteínas o con la membrana[42,81,526,527]. Entre las proteínas que presentan este tipo de dominios se encuentran la mayoría de las DGK[238], a excepción de DGKβ y DGKγ que al menos tienen un dominio C1 típico[434], vav[86], raf[153], ROCK[147,212], CRIK[309], Lfc[524], y C1-TEN[163].

2 Proteínas Reguladas por DAG

Todas las proteínas que presenten en su estructura un dominio C1 típico son susceptibles de ser activadas por DAG. Además de PKC, hasta el momento, se han descrito otros seis tipos de proteínas que tienen un dominio C1 capaz de unir ésteres de forbol, lo que ha diversificado en gran medida las funciones del DAG como segundo mensajero lipídico. Son: quimerina[165], DGK (sólo β y γ)[434], PKD[490], Munc13[50], RasGRP[114] y MRCK[472] (FigI5).




```
                1                   11                  21                  31                  41
C1bPKCδ         HRFKVYNYMS  PTFCDHCGSL  LWGLVKQGLK  CEDCGMNVHH  KCREKVANLC
C1bPKCθ         HRFKVYNYKS  PTFCEHCGTL  LWGLARQGLK  CDACGMNVHH  RCQTKVANLC
C1β2Qui         HNFKVHTFRG  PHWCEYCANF  MWGLIAQGVR  CSDCGLNVHK  QCSKHVPNDC
C1RasGRP1       HNFQETTYLK  PTFCDNCAGF  LWGVIKQGYR  CKDCGMNCHK  QCKDLVVFEC
C1aPKCθ         HEFTATFFPQ  PTFCSVCHEF  VWGLNKQGYQ  CRQCNAAIHK  KCIDKVIAKC
```

Figura I4 – Dominio C1, estructura y secuencia
En la parte superior se muestra la estructura terciaria de un dominio C1 típico, C1b de PKCδ (PDB ID:1PTR), y en la parte inferior el alineamiento de su secuencia con la de los dominios C1 analizados en nuestro trabajo experimental. En azul oscuro y en forma de flecha las conformaciones β, en rojo, y con forma de muelle, la α-hélice, en gris y en representación esférica los residuos implicados en la coordinación de Zn^{2+}, en rosa los que interaccionan con PMA, en azul claro los necesarios para el mantenimiento de la estructura y en violeta los que cumplen estas dos funciones. En verde, PMA y en amarillo, Zn^{2+}.

A) Proteína quinasa C (PKC)

En la actualidad se conocen 9 formas de PKC (revisado en 100,342,343,450) todas ellas con un dominio catalítico conservado (C3/C4) que se encarga de su actividad Ser/Thr quinasa. Estas nueve proteínas se han agrupado en tres categorías en función de los dominios reguladores que presentan en su estructura primaria que van a definir su mecanismo de activación (Fig.I5). Son: PKC clásicas o convencionales (PKCc): α, β (I,II) y γ, PKC nuevas (PKCn): δ (I-III), ε, η y θ (I,II) y PKC atípicas (PKCa): ζ y λ/ι. Las PKCc presentan dos dominios C1 típicos (C1a y C1b en función de la proximidad al extremo N-terminal) y un dominio C2 que tras unir Ca^{2+} permite la unión de PS[87,501] y al menos en el caso de PKCα, parece que también puede unir PIP_2[125,315]. Las PKCn son similares a las clásicas pero su dominio C2 no necesita de la colaboración del Ca^{2+} para la unión de PS[354] y se ha descrito su papel en la interacción proteína-proteína. Las PKCa tienen un único dominio C1 atípico y no presentan dominio C2 por lo que no se conocen exactamente los factores que participan en su activación.

La **activación** de las formas de PKC clásicas y nuevas se produce en varios pasos de fosforilación y posterior unión a DAG y PS en la membrana[365]. La traducción del ARNm de estas proteínas da lugar a una enzima incapaz de llevar a cabo la reacción de fosforilación; para obtener una enzima competente es necesaria su fosforilación en el bucle de activación, por PDK1, y la posterior autofosforilación en otros dos residuos del dominio catalítico. Esta enzima fosforilada permanece inactiva hasta que se produce un aumento de DAG y Ca^{2+} (ambos son necesarios para las PKCc pero no para las PKCn). La unión de la proteína al DAG provoca un cambio conformacional que permite separar el pseudosustrato que bloquea la región catalítica generando una enzima activa. La participación de cada uno de los dominios C1 en la activación de las PKC parece ser muy dependiente de la forma de PKC estudiada[196,380,444,446]. Así, se ha descrito que los distintos dominios C1 de las PKC tienen una afinidad específica por ésteres de forbol[209,433] y se han descrito distintos mecanismos de acción en función de esta afinidad y de la dependencia de PS en la unión[39,455,456].

El estudio de las **funciones** de PKC ha relacionado a estas proteínas con numerosos procesos de señalización celular aunque se desconoce exactamente el papel que juega cada una de las formas descritas. La dificultad de estos estudios reside en que la mayoría de estas proteínas son ubicuas, fosforilan los mismos sustratos in vitro y además no existen inhibidores específicos. Teniendo en cuenta estas similitudes se considera que la pieza clave que define la especificidad de función de cada forma de PKC es su mecanismo de activación y la interacción con proteínas celulares que van a controlar su actividad tanto espacial como temporalmente (RACK, STICK, PICK)[335,422].

Hasta el momento se han llevado a cabo algunos estudios de modificación genética tanto por sobre-expresión de algunas de las formas como generando ratones deficientes por recombinación homóloga. KO PKCα: presenta alteraciones en el proceso de concentración de la orina[545] y en la señalización inducida por insulina dependientes de PI3K[273]. KO PKCβ: tiene problemas en linfocitos B y en mastocitos[272]. Disminuye el número de células B y también los niveles de IgM y IgG3 en sangre; los linfocitos B no proliferan en respuesta a la estimulación con IgM por problemas en la inducción de genes controlados por NF-κB[463]. KO PKCγ: se caracteriza por defectos neurológicos, principalmente por fallos en la transmisión del potencial de larga duración que se refleja en problemas en el aprendizaje[2]. KO PKCδ: se detectan fenómenos de esplenomegalia y linfoadenopatía provocados por el incremento de linfocitos B. Los ratones mueren prematuramente debido al desarrollo de enfermedades autoinmunes caracterizadas por la aparición de anticuerpos y células B autorreactivas que siguen un proceso de diferenciación convencional en lugar de transformarse en anérgicas[325,333]. Parece que este fenotipo es provocado por

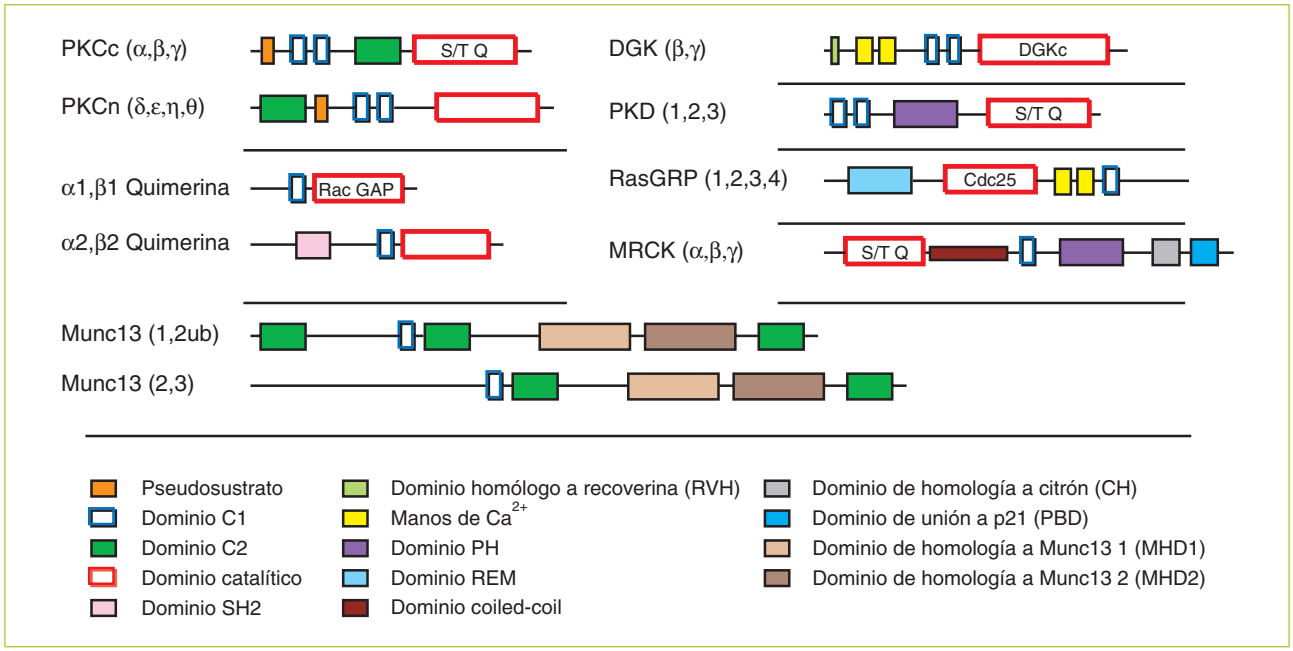


Figura I5 – Proteínas reguladas por DAG y sus principales dominios
Se representan de forma esquematizada los dominios característicos de proteína quinasa C (PKC), quimerina, diacilglicerol quinasa (DGK), proteína quinasa D (PKD), factor intercambiador de guanina de Ras (RasGRP), quinasa relacionada con miotonina que une Cdc42 (MRCK) y Munc13. S/T Q: dominio con actividad Ser/Thr quinasa, Rac GAP: dominio con actividad GAP para Rac, DKGc: dominio catalítico de DGK, Cdc25: dominio con homología a Cdc25.

fallos en la vía de NFκB. Los ratones también presentan cambios en el metabolismo de las células cardiacas[323] que se traducen en un mayor daño cardiaco en procesos de isquemia[324]. KO PKCε: presenta alteraciones en los macrófagos y de hecho los individuos son incapaces de contrarrestar determinadas infecciones bacterianas y mueren por esta causa[69]. Una vez más se detectan cambios en la vía de NFκB que afectan la producción de NO, prostaglandinas o TNFα que explican el fenotipo de los ratones[69]. Estudios funcionales más detallados de estos ratones han implicado también a PKCε en hipoxia[289], daño cardiaco[225,255,420] y tolerancia al alcohol[75,359]. KO PKCθ: tiene problemas en la señalización de células T: proliferan menos y producen menos IL2[372,464]. Este efecto probablemente se debe a que los ratones presentan una menor inducción de los genes controlados por AP-1 y NFκB. También presenta alteraciones en el transporte de glucosa en algunos tejidos[252].

B) Quimerinas

Se describieron a comienzos de los años 90 como unas proteínas con actividad GAP para miembros de la familia de Rho que contenían en su secuencia primaria un dominio C1 capaz de unir ésteres de forbol[4,165]. En la actualidad se conocen dos genes, α y β, con dos formas de procesamiento alternativo cada uno de ellos, 1 y 2, que dan lugar a los cuatro miembros de esta familia. Todos ellos conservan un dominio GAP y un dominio C1 que muestra una afinidad por ésteres de forbol similar a C1 típicos de PKC pero que sin embargo, es incapaz de unir otros compuestos como merezeínas[60]. Las formas α2[166] y β2[276] son más largas y presentan en el extremo N-terminal un dominio SH2 que puede unir proteínas fosforiladas en Tyr aunque se desconoce cuáles podrían ser éstas en los contextos donde actúan α2 y β2 (Fig.I5).

El mecanismo de **activación** de las quimerinas no se conoce en detalle aunque recientemente se ha cristalizado la proteína en su forma inactiva y se ha demostrado que los dominios C1 y GAP están ocultos hacia el interior de la estructura manteniendo estas posiciones gracias a interacciones intramoleculares[65]. Por lo tanto, para que la proteína sea activa, es necesario un cambio conformacional que exponga estos dominios lo que provocará en primer término, el anclaje de la proteína en la membrana gracias a la interacción del dominio C1 con DAG y en segundo, la aparición de un dominio GAP disponible para la catálisis. Aunque se desconoce cómo se induce este cambio conformacional se postula que en el proceso pueden participar fosfolípidos ácidos como PA o PS capaces de aumentar la actividad GAP in vitro[5,61].

Las quimerinas se expresan fundamentalmente en cerebro[107,166] aunque α2[166] y β1[275] también se detectan en testículo, donde participan en la espermatogénesis, y β2, en páncreas[549] y en diferentes líneas celulares obtenidas a partir de leucemias humanas y en PBL[440]. Respecto a sus **funciones**, controlan la dinámica del citoesqueleto de actina al actuar como GAP para proteínas de la familia Rho, fundamentalmente Rac aunque in vitro también tienen actividad sobre Cdc42[179,263]. En este sentido tiene un papel importante en al menos tres procesos en los que es esencial un control riguroso del citoesqueleto: la diferenciación neuronal, regulando la formación de espinas dendríticas[167] o el crecimiento axonal en respuesta a señales inhibitorias[334] como las de semaforinas[54,377]; la progresión tumoral[543,549] y la migración leucocitaria[440]. Otro aspecto interesante respecto a su función es que se ha descrito su interacción dependiente de estimulación con ésteres de forbol con proteínas que podrían definir su localización subcelular como Tmp21[514] o un receptor de NMDA[494]; de esta forma se establece un nuevo punto de control de su actividad.

C) Diacilglicerol quinasa (DGK)

Revisadas en la tabla I1. Sólo las formas β y γ presentan un dominio C1 típico capaz de unir ésteres de forbol[434].

D) Proteína quinasa D (PKD)

Este grupo está formado por tres proteínas: PKD1, PKD2 y PKD3. Inicialmente PKD1 y PKD3 se describieron como miembros de la familia de PKC debido a su actividad Ser/Thr quinasa y a la presencia de dos dominios C1; por esta causa PKD1 se denomina PKCμ en humanos y PKD3 se conoce también con el nombre de PKCν. Su clasificación fuera del grupo de las PKC se debe, entre otras razones, a las diferencias en el dominio catalítico, a la ausencia de un pseudosustrato en su secuencia primaria y a la presencia de un dominio PH localizado entre los dominios C1 y la región catalítica (Fig.I5) (revisado en 408,496).

El principal mecanismo de **activación** de PKD consiste en la fosforilación, dependiente de PKC, de dos residuos de Ser en la región catalítica[202]. Según el tipo celular y el estímulo que induce la activación se ha descrito la participación de distintas PKC: PKCα[280,528], PKCδ[280,473], PKCε[45,393,512,560], PKCη[46,560] y PKCθ[548]. En la mayoría de los casos la señal que induce la activación de PKD implica un incremento en la concentración de DAG por actividad PLC o directamente por la adición de análogos como ésteres de forbol[495,560]. Este aumento promueve la localización de PKD y PKC en el mismo contexto celular permitiendo la activación de PKC y la posterior fosforilación de PKD[393].

Se han descrito también otros mecanismo en los que la producción de DAG no parece ser el factor desencadenante de la activación. La fracción de PKD1 asociada a Golgi se activa por la interacción directa, a través del dominio PH[218], con determinadas subunidades de Gβγ[102] que a su vez, promueven un incremento de DAG que permite la activación de PKCη y la consiguiente fosforilación de PKD[102]. En el caso de la activación de PKD inducida por

estrés oxidativo se produce una fosforilación en Tyr en el dominio PH[460], dependiente de Abl o Src[461,511], y una posterior fosforilación por PKCδ, activada a su vez por Src[462].

Se cree que la activación de PKD en todos estos casos se basa en un cambio conformacional promovido por la fosforilación o por la interacción con otras proteínas. Este cambio permite el desplazamiento de la región reguladora (dominios C1 y PH) de su posición original, desbloqueándose el centro de catálisis y dando como resultado una proteína activa[21,201,203,512]. Esta PKD, ya activa, es capaz de autofosforilarse en un residuo de Ser en el extremo C-terminal (descrito sólo en PKD1 y PKD2) cuya fosforilación es un indicador del estado de activación de la proteína[320,503]. También se ha descrito que PKD puede ser proteolizada por caspasas[117,497] generando una proteína que pierde los dominios C1; la ausencia de estos dominios, inhibitorios en la estructura terciaria[203], da como resultado una proteína activa.

En ausencia de activación y dependiendo del tipo celular, la **localización subcelular** de PKD es citosólica, nuclear o con cierta señal asociada a la membrana del aparato de Golgi. En respuesta a la estimulación la proteína transloca a la membrana plasmática[319,321] de forma transitoria ya que una vez fosforilada regresa al citosol donde permanece activa[161,387,391,393]. En respuesta a la activación de algunos receptores acoplados a proteínas G, PKD una vez activa y en el citosol, puede translocar al núcleo y volver al citosol[389,390,392] gracias a la presencia de una señal de localización nuclear (NLS) y otra de exporte (NES) que se encuentran en parte del dominio C1a y en la región entre los dos dominios C1[21]. Estas secuencias están altamente conservadas entre los tres miembros de la familia de PKD[21].

La localización en la membrana plasmática o en Golgi está controlada por la pareja de dominios C1. Aunque existe cierta controversia en cuanto a su afinidad por ésteres de forbol y DAG[208,516], el dominio C1a está implicado en el mantenimiento de la localización interna por su interacción con DAG[29,175,311,388] y el dominio C1b se encarga de la translocación a membrana plasmática[14,319], donde se ha descrito que podría interaccionar con Gαq[353]. El dominio PH a pesar de estar diseñado para unir lípidos no es necesario para la asociación con membranas pero sí con otras proteínas como PKC[46,510] o Gβγ[218]; también está implicado en el proceso de exporte del núcleo[389]. La localización subcelular de PKD va a definir en gran medida la actividad y los posibles efectores de esta proteína como se ha demostrado con la generación de ratones transgénicos que presentan distinto fenotipo en función de si PKD se expresa constitutivamente en la membrana plasmática o en el citosol[316]. A favor de este tipo de regulación, debida a la localización, también se ha comprobado que la disgregación de los rafts, a donde se desplaza PKD en respuesta a PDBu en células PC12, permite su activación[59].

En cuanto a las **funciones** celulares de PKD todavía no se conocen en profundidad ya que apenas se han descrito proteínas que sean sustrato de su actividad. Se sabe que PKD es importante en la activación de NFκB en los procesos de estrés oxidativo[461] y que forma parte de las cascadas de señalización inducidas por la activación de BCR[439] y de TCR[322]. En éste último caso para la activación de PKD son necesarios otros factores inducidos por DAG pero independientes de PKC[529].

PKD también participa en el control de la proliferación, la diferenciación y la apoptosis fundamentalmente modificando la actividad de las cascadas de Jnk[197] y MEK[442,518] y la localización subcelular de histonas deacetilasas, que han de permanecer defosforiladas, en el núcleo, para controlar la expresión de determinados genes[368,500]. Otro de los sustrato de PKD, posiblemente implicado en diferenciación neuronal es Kidins220[204]. Además, la expresión de PKD se modula a lo largo de la diferenciación de queratinocitos[122] y en procesos tumorales de próstata[215] o páncreas[486]. Otro aspecto también relacionado con la proliferación y tumorogénesis en el que PKD juega un papel, es en la regulación del citoesqueleto y la motilidad celular por interacción con proteínas como paxilina[44], Rap1[326], integrinas[530] o E-cadherina[216], participando en su activación y localización.

Finalmente se ha demostrado que la actividad PKD es esencial en el mantenimiento de una región trans-Golgi funcional[218,286] que permita el correcto transporte de proteínas desde el Golgi hacia la membrana plasmática en células no polarizadas[102,375] y hacia la región basolateral en células polarizadas[546]. Se ha postulado en este contexto el papel de proteínas que controlan los niveles de lípidos y que son activadas por fosforilación por PKD como PI4K y PI4P5K[176,347].

E) Munc13

En un principio se describieron 3 proteínas, Munc13-1, Munc13-2 y Munc13-3 por homología con Unc13 de *Caenorhabditis elegans*[50]. Estas tres proteínas se expresan fundamentalmente en cerebro a excepción de una forma de procesamiento alternativo de Munc13-2 que es ubicua (Munc13-2ub)[258]. Basándose en el estudio de la secuencias de estas proteínas y otras relacionadas en otros organismos se encontraron unos dominios conservados que se denominan dominios de homología de Munc13 (MHD) que permitieron localizar un nuevo miembro de la familia en las bases de datos, Munc13-4[258] (Fig.I5).

Todas las proteínas Munc13, a excepción de Munc13-4, presentan un dominio C1 típico capaz de unir ésteres de forbol con baja afinidad[210] probablemente,

porque el surco de unión está bloqueado por el Trp en posición 22 tal como se ha demostrado al obtener su estructura por RMN[430]. Además, tienen dos o tres dominios C2 que unen Ca^{2+} y PS y recientemente se ha descrito en Munc13-1 un dominio de unión a calmodulina[232] que va a permitir a la proteína llevar a cabo su función a bajas concentraciones de Ca^{2+}. La ausencia de regiones implicadas en catálisis entre los miembros de esta familia explica su papel como proteínas adaptadoras.

La **función** establecida para las proteínas Munc13-1, 2 y 3 es la maduración de las vesículas sinápticas en la región presináptica para permitir su exocitosis[18]. Aunque se desconoce exactamente como se lleva a cabo este proceso es necesaria la presencia de las proteínas Munc13 con un dominio C1 funcional para que interaccionen con proteínas como Doc2[361], Rim[36,112], sinaptobrevina o sintaxina[34] que participarán de forma directa en la exocitosis. En los ratones KO para Munc13-1 se bloquea la exocitosis en las sinapsis excitatorias (glutamatérgicas) mientras que las inhibitorias (GABAérgicas) no se ven afectadas[23]; éstas, al menos en el hipocampo, están reguladas por Munc13-2[498]. En el KO de Munc13-3, aunque se produce el mismo bloqueo de la exocitosis, el fenotipo es menor debido a su expresión muy localizada en el cerebelo[24]. Ratones KO para los tres miembros de la familia de Munc13 implicados en sinapsis nerviosa nacen paralizados y mueren por la formación defectuosa de las placas motoras que inervan los músculos[499]. Munc13-1 se expresa también en los islotes β del páncreas donde participa en la secreción de insulina[431] y en el cerebro, junto con PKC, colabora en la secreción de proteína amiloide[403]. En el caso de Munc13-4, a pesar de no presentar un dominio C1 en su estructura es necesaria para la exocitosis en mastocitos, plaquetas[436] y células T citotóxicas[130] y de hecho su locus está relacionado con varias enfermedades humanas que cursan con defectos en la secreción en estos tipos celulares[130,539].

El papel del dominio C1 en estas proteína parece ser permitir su anclaje a la membrana plasmática para localizar así a las proteínas que interaccionan con Munc13 en esta ubicación[35]. Recientemente se ha descrito que la expresión de la región comprendida entre el segundo y tercer dominio C2 de Munc13-1 es suficiente para recuperar parcialmente el fenotipo de los ratones deficientes[30]. Por lo tanto, el resto de los dominios de la proteína, incluido el C1, se encargarán de modular la exocitosis en función de las condiciones de la región presináptica generando así una mayor plasticidad y dinamismo en el proceso.

F) MRCK

Este grupo está constituido por tres proteínas, MRCKα, MRCKβ y MRCKγ[653]. En su estructura primaria presentan, en el extremo N-terminal, la región catalítica con actividad Ser/Thr quinasa, a continuación una región coiled-coil, un dominio C1 que a pesar de no presentar los residuos característicos de los C1 típicos une ésteres de forbol en presencia de PS[472], un dominio PH relacionado con la localización subcelular[277], un dominio de homología a citrón y un dominio de unión a p21 (PBD), por el que interaccionan con Cdc42 en su forma GTP[277]. MRCKα contiene dos dominios PBD y el segundo une Rac-GTP[553].

En estas proteínas la unión de ésteres de forbol al dominio C1 va a permitir la **activación** de la proteína al producirse un cambio conformacional que libera el centro catalítico del efecto inhibitorio del extremo carboxilo de la región coiled-coil[472]. Una vez que ha tenido lugar este cambio las proteínas se transfosforilan en distintos residuos ya que se encuentran formado dímeros o tetrámeros[472].

En cuanto a su **función**, se ha relacionado a MRCK con el crecimiento de neuritas[472] y la invasión metastásica[525], participando en el control de la dinámica de actina-miosina al fosforilar la cadena ligera de miosina 2 (MLC2)[277].

3 RASGRP

Este grupo está formado por 4 proteínas, RasGRP1[114] o CalDAG-GEFII[241], RasGRP2 o CalDAG-GEFI[241], RasGRP3 o CalDAG-GEFIII[541] y RasGRP4[281]; todas ellas están reguladas por DAG y tienen actividad GEF sobre distintos miembros de la familia de Ras. A excepción de RasGRP3, que tiene un patrón de expresión más general[383], el resto de los miembros del grupo son prácticamente exclusivos de células leucocitarias o nerviosas con una expresión diferencial y no solapante entre ellos; así, RasGRP1 se expresa fundamentalmente en timocitos y linfocitos T[115], RasGRP2 en plaquetas[91] y RasGRP4 en mastocitos[281].

A) Estructura y regulación

Todas las proteínas del grupo presentan la misma estructura base a excepción de RasGRP1, que tiene un extremo C-terminal más largo[114] (Fig.I6) y algunas variantes de RasGRP2 y RasGRP4, con pequeños cambios. En humanos se han identificado 2 formas de procesamiento alternativo para RasGRP2, una de ellas, RasGRP2_1 (AF043722) se puede miristoilar y palmitoilar en su extremo N-terminal por lo que se expresa fundamentalmente asociada a membrana plasmática[82]. Esta forma no ha podido detectarse en ratón donde sí se ha encontrado otra variante que se genera por una señal de poliadenilización prematura que codificaría sólo para el dominio REM pero que no parece dar lugar a proteína[113]. En el caso de RasGRP4 se han detectado numerosas isoformas en humanos[544]: RasGRP4_1 (NM_170603) y RasGRP4_4 (NM_170604) sólo se diferencian en la región 3´ no traducida y codifican para la proteína completa (674 residuos), mientras que RasGRP4_3 (NM_052949) tiene un

codón de parada prematuro y genera un mensajero que sólo codifica para el dominio REM y RasGRP4_2 (NM_170602) da lugar a una proteína con la región de conexión entre el dominio REM y Cdc25 más corta.

En la región N-terminal de RasGRP se encuentran los dominios implicados en catálisis, **dominio REM** y **dominio de homología a Cdc25** (Fig.I6), ambos absolutamente necesarios para la actividad de estas proteínas[40,114,355,479]. El estudio de estas dos regiones en otros GEF de la familia de Ras, como Sos, ha permitido concluir que el dominio Cdc25 está implicado directamente en la catálisis; al interaccionar con Ras permite un cambio en los dos bucles que retienen la molécula de GDP provocando su salida y la posterior entrada de GTP[43]. Respecto al dominio REM, no es esencial para la función de la proteína in vitro pero su presencia permite que las hélices de Cdc25 que interaccionan con Ras se mantengan en la posición correcta para que el contacto sea funcional[313]. Recientemente se ha comprobado que el dominio REM de Sos no sólo tiene esta función estructural, sino que regula la actividad GEF de la proteína gracias a la presencia de un sitio de unión de RasGTP, distinto al de catálisis, que tiene que estar ocupado para que la proteína sea activa[448].

A continuación, hacia el extremo carboxilo, se encuentra la región reguladora formada por dos manos de Ca^{2+} y un dominio C1 (Fig.I6). Cada una de las **manos de Ca^{2+}** presenta un bucle canónico de 12 aminoácidos que se encarga de la coordinación de un ión de Ca^{2+}: X*Y*ZGyIx**z (residuos implicados en la coordinación: conservados, generalmente Asp o Glu: XYZz, o variables: xy, glicina, G, isoleucina, I, y cualquier aminoácido, *)[278]. En otras proteínas que contienen estos dominios, la unión de Ca^{2+} provoca un cambio conformacional que se traduce en una modificación de su actividad, de su interacción con otras proteínas u otros efectos[278]. En el caso de RasGRP todavía no se sabe exactamente cuál es su función ya que cada miembro de la familia se regula de forma distinta en presencia de Ca^{2+}. RasGRP1 y RasGRP3, a pesar de unir este catión[114], no lo necesitan para activarse[115,295,479], RasGRP2 actúa sobre distintos efectores en función de su concentración en el ensayo[82] y RasGRP4 se inactiva[281,282]. El análisis de las secuencias en esta región, muestra que RasGRP4 no conserva alguno de los residuos implicados en la coordinación, en ninguna de las manos de Ca^{2+}, por lo que probablemente, sea incapaz de unir este catión y por lo tanto la regulación debe ocurrir a otro nivel.

El **dominio C1** presenta los residuos característicos para la unión de ésteres de forbol salvo en el caso de RasGRP2 que entre otros no tiene conservado el Trp en posición 22. Se ha demostrado que este C1 es incapaz de unir PDBu[210] y que la proteína completa, RasGRP2, no

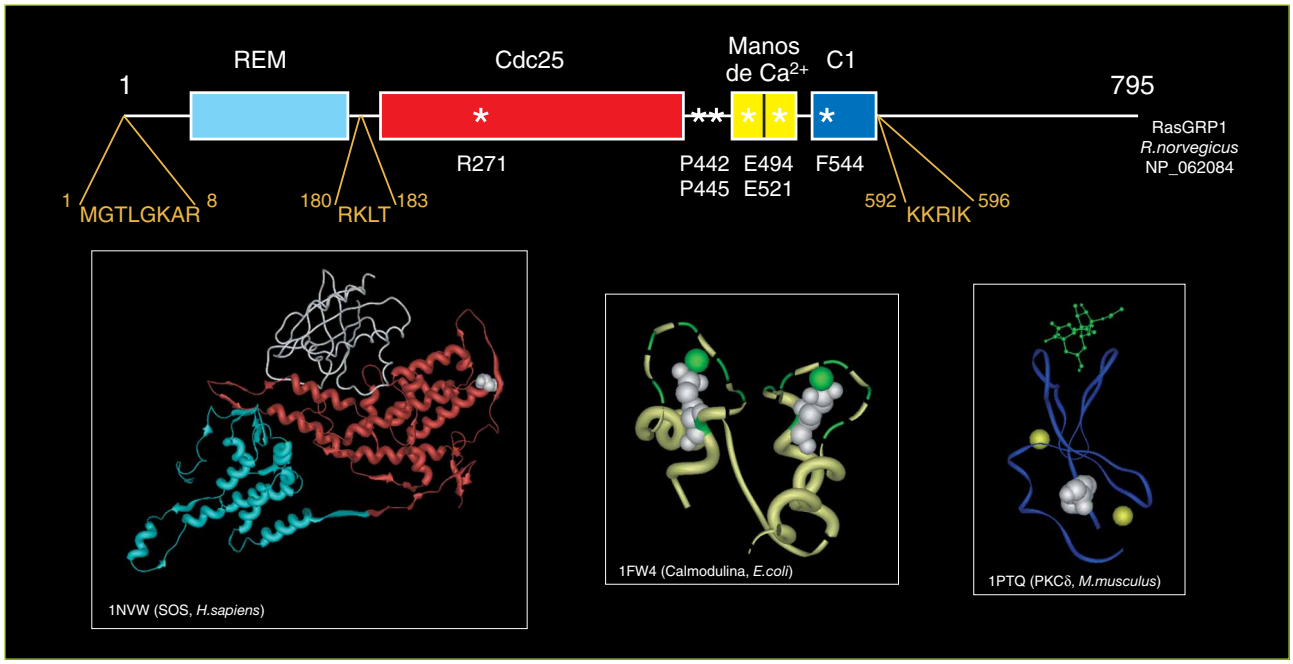


Figura I6 – Principales dominios y secuencias reguladoras de RasGRP1
Esquema de los dominios presentes en RasGRP1. En ocre secuencias descritas como elementos relevantes en su regulación, en blanco e indicando su posición con asteriscos, aminoácidos mutados en nuestro estudio. En los recuadros inferiores, estructura, en otras proteínas, de los dominios presentes en RasGRP1, en blanco y en representación esférica los residuos equivalentes, en cada caso, a los mutados en nuestro estudio. En el panel inferior izquierdo, dominios REM y Cdc25 de Sos interaccionando con Ras (en blanco); en el centro manos de Ca^{2+} de calmodulina con los residuos implicados en la coordinación de los cationes (esferas verdes), en verde; a la derecha dominio C1b de PKCδ unido a PMA (verde) y Zn^{2+} (amarillo).

responde a la adición de ésteres de forbol en términos de translocación[64] aunque su actividad sí se modula en presencia de TPA[241]. Tras los 50 aminoácidos del dominio C1 se encuentran una serie de residuos básicos conservados en los 4 miembros de la familia[479]. La incorporación de estos residuos básicos en el C-terminal de un péptido sintético correspondiente al dominio C1 de RasGRP1 o de RasGRP3, incrementa su carga positiva y como consecuencia su afinidad por PDBu[210].

El dominio C1, probablemente apoyado por el conjunto de aminoácidos básicos en su extremo C-terminal, permite la localización en membrana de la proteína donde se encontrará con su sustrato. En los mutantes en los que se elimina el dominio C1 se pierde la localización de membrana y la activación de los efectores de RasGRP inducida por PMA u otros estímulos[62,114,355,402,479]. En el caso de RasGRP1 la sobreexpresión de este mutante ya no es capaz de inducir transformación pero si el dominio C1 se sustituye por otro dominio C1 típico como C1b de PKCδ o por la señal de prenilación de K-Ras, la proteína quimérica es capaz de promover la proliferación, confirmando la relevancia del dominio C1 y de DAG en la localización[479]. Un dato más que confirma la importancia de DAG en la regulación de estas proteínas es la capacidad de algunas DGK de modular su actividad. DGKζ y DGKι interaccionan con RasGRP1[484] y RasGRP3[384], respectivamente, provocando la disminución de sus actividades y DGKα controla también el nivel de activación de RasGRP1[229] y su cinética de translocación[417]. RasGRP4 disminuye su actividad en presencia de DGKζ[384].

Existen otros mecanismos de regulación para los miembros de la familia de RasGRP. RasGRP1 y RasGRP2_1, en su N-terminal, tienen una posible secuencia de **miristoilación** que en el caso de RasGRP1 no es importante para la función de la proteína[479] pero quizá sí lo sea para RasGRP2_2 ya que su dominio C1 es incapaz de unir PDBu. Esta secuencia debería cumplir los siguientes requisitos: considerando la Gly de miristoilación como 1, en la posición 2 debe haber un residuo sin carga, nunca Asp, Glu, Arg, Lys, His, Pro, Phe, Tyr o Trp; en las posiciones 3 y 4 cualquier aminoácido; en la posición 5 pequeños residuos sin carga, fundamentalmente Ser y en la posición 6, cualquier aminoácido a excepción de Pro (secuencia consenso según PROSITE http://www.expasy.org/prosite/). RasGRP1 tiene en la posición 5, una Lys que es un aminoácido con carga por lo que no cumple la secuencia consenso y no puede ser miristoilada. RasGRP2_2 conserva todos los residuos y en la posición 6 una Cys que es susceptible de palmitoilación[82].

RasGRP1 y RasGRP3 se **fosforilan** por PKC en Thr184 y Thr133 respectivamente[554], dos posiciones equivalentes que se encuentran en la región de conexión entre el dominio REM y Cdc25 por lo que probablemente sean relevantes para la regulación de la actividad catalítica. En ambos casos se ha detectado la fosforilación de estos residuos en paralelo a la activación de los efectores de RasGRP[402,554] y además un mutante T133A en RasGRP3 no activa Ras en respuesta a PMA[554]. Las posibles PKC involucradas aún no se han descrito con claridad pero en el caso de RasGRP1 podría ser PKCθ[554] y para RasGRP3 PKCδ[49]. RasGRP3 presenta al menos otros dos residuos fosforilables por PKC cuya mutación a Ala genera una proteína más activa[6]. También se ha demostrado su fosforilación en Tyr, mediada por Src, en respuesta a EGF[459].

RasGRP1 y RasGRP2 se regulan por su interacción directa con el **citoesqueleto de actina**, este contacto, en el caso de RasGRP2, se produce a través de la región comprendida entre los residuos 1 y 150[64]. Ambas proteínas se activan en presencia de Rac constitutivamente activo o con la sobreexpresión de Vav, un GEF para Rac[63,64]. En estas condiciones, Rac y RasGRP colocalizan con F-actina y RasGRP precipita con actina polimerizada in vitro lo que indica que la interacción es directa. En células B deficientes en Vav3[63], con RasGRP1 sobre-expresada, o en las células T de los ratones KO de Vav1[394], la proteína no se activa ni transloca en respuesta a la adición de IgM o a la estimulación del TCR, respectivamente. Aunque el efecto de la ausencia de Vav sea el mismo en las dos condiciones parece que en las células B, RasGRP1 no se activa por problemas en el citoesqueleto de actina mientras que en las células T, la causa es la insuficiente activación de PLC y consiguiente bajada de los niveles de DAG que provoca la deficiencia de Vav. Resulta destacable que en estos ratones, sin Vav1, la localización basal de RasGRP1 está alterada y se encuentra en la fracción particulada de partida; este efecto parece ser dependiente de la menor actividad PLC de estas células[394].

B) Localización subcelular

Hasta el momento no hay datos de la localización de las proteínas endógenas pero con la expresión de construcciones fusionadas a distintos epítopos o proteínas fluorescentes se ha detectado su presencia en el citosol con cierto enriquecimiento, en función del tipo celular, en membranas internas[62,295] o plasmática[355] o en la zona de actina periférica[484]. RasGRP2_1 localiza fundamentalmente en membrana debido a su miristoilación y palmitoilación[82] con una señal residual en el citosol.

En respuesta a ésteres de forbol o estímulos que activan alguna PLC todas las proteínas a excepción de RasGRP2 translocan rápidamente a la fracción particulada en estudios de fraccionamiento subcelular[114,115,295,385,479]. Para esta translocación es necesaria la presencia de un dominio C1[62,114,479] y parece que la especificidad por una membrana u otra la definen otros factores, dependientes[479] o no de la propia secuencia de RasGRP. Se ha descrito que RasGRP1 localiza en Golgi[40] en respuesta a la activación del TCR en función de la intensidad[369] y duración de la estimulación[417] y sin embargo otros grupos han demostrado su translocación

a membrana plasmática[63]. Además, en células adherentes, la expresión exógena de la proteína conduce a su acumulación en membranas internas[62].

RasGRP2 aunque presenta un C1 atípico, incapaz de unir ésteres de forbol, puede translocar a membrana tras 15 minutos de estimulación con PMA lo que indica que probablemente este movimiento sea dependiente de la activación previa por PMA de otras proteínas[82].

La localización subcelular de estas proteína va a definir en gran medida su función ya que se sabe que la especificidad de las GTPasas de la familia de Ras por sus efectores es dependiente, entre otros factores, de dónde se produzca su activación[373].

C) Funciones descritas

La función de estas proteínas varía según cuáles sean sus efectores ya que cada una de las formas de RasGRP actúa sobre distintos miembros de la familia de Ras. Esta especificidad no parece ser dependiente de la región reguladora ya que la actividad in vivo de quimeras que combinan diferentes regiones reguladoras con catalíticas se define por el dominio GEF y Cdc25[541]. Los efectores descritos hasta el momento son: RasGRP1: H-Ras[479], K-Ras[479], N-Ras[479], M-Ras[356], R-Ras[241] y TC21[356]; RasGRP2: Rap1[241], R-Ras[356], N-Ras[82] y TC21[356]; RasGRP3: H-Ras[356], Rap1[383], M-Ras[356], R-Ras[356] y TC21[356]; RasGRP4: H-Ras[281].

RasGRP1 es esencial para la activación de la vía de ERK tras la estimulación del TCR[115,402] y ésta es la principal causa de que los ratones deficientes en esta proteína sean incapaces de llevar a cabo el proceso de selección positiva en el timo[108,374]. Estos ratones presentan porcentajes muy bajos tanto de timocitos SP como de linfocitos T[108]. Las células T son menos maduras que en los ratones control y son incapaces de proliferar en respuesta a la estimulación del TCR o de IL2, a pesar de expresar CD25 en superficie[269,374]. Sorprendentemente, estos ratones a los 3 o 4 meses de edad desarrollan un fenotipo de autoinmunidad que se caracteriza por una linfoadenopatía aguda acompañada de altos niveles de IgG y ANA (anticuerpo anti-nuclear) en sangre. La principal causa del desarrollo de esta enfermedad es el aumento en periferia de células $CD4^+$ autorreactivas, que aunque no pueden proliferar, mueren menos por AICD y además son capaces de activar células B pero no inducir su muerte por apoptosis. Así que el defecto en la diferenciación tímica de estos ratones genera unas células $CD4^+$ alteradas que, en los animales adultos, dan lugar al fenotipo de autoinmunidad[269].

La expresión de RasGRP1 varía a lo largo del desarrollo tímico alcanzando su máximo en el estadio de dobles positivos[349]. La generación de transgénicos ha demostrado que la expresión no controlada de RasGRP1 durante este periodo provoca o bien un aumento de células $CD8^+$ que proliferan a mayor velocidad que las $CD4^+$ en respuesta a la estimulación con αCD3[349] o un incremento de células DP o SP no dependiente de estimulación[256]. En ambos casos, en estos animales, se desarrollan linfomas tipo T. De hecho, la expresión de RasGRP1 también se induce en modelos de ratón donde se provocan leucemias tipo T por la inserción en el genoma de retrovirus[253,279].

En modelos menos fisiológicos también se ha implicado a RasGRP1 en la diferenciación de queratinocitos[381] y en la inducción de apoptosis en células B[162].

RasGRP2 es esencial en el control de la adhesión en plaquetas ya que al activar Rap va a participar en la regulación de la afinidad y avidez de las integrinas[91]. Además, su expresión está regulada por un factor de transcripción que controla genes implicados en la activación de integrinas (NF-E2)[124]. Los ratones KO para RasGRP2 presentan graves problemas de coagulación como consecuencia de la incapacidad de las plaquetas de agregar entre ellas para formar el coágulo[91].

RasGRP2 se ha implicado en el desarrollo de tumores en humanos ya que su locus está frecuentemente amplificado en esta situación[295]. En modelos de ratón una inserción retroviral en su región cromosómica provoca un aumento de expresión que se ha relacionado con la aparición de leucemias mieloides agudas[113].

RasGRP3 es capaz de modular tanto a Ras como a Rap que en la célula tienen funciones antagónicas por lo que ha de jugar un papel esencial en el equilibrio entre estas dos vías. Hasta el momento se ha descrito su importancia para la exocitosis inducida por PMA en células neuroendocrinas como PC12[363], en procesos de angiogénesis durante los que su expresión se regula[395] y en la activación de células B tras la estimulación con IgM[355]. Los ratones deficientes para RasGRP3 no presentan ningún fenotipo evidente[395] aunque un análisis más detallado ha demostrado la participación de esta proteína en la señalización de las células B en periferia pero no en su desarrollo[89]. El doble KO RasGRP1/3 no desarrolla el fenotipo de autoinmunidad característico de los ratones deficientes en RasGRP1. Los linfocitos B autorreactivos no se activan en estos animales y por lo tanto, no aumentan los niveles de anticuerpos en sangre, lo que de nuevo indica un papel de RasGRP3 en la regulación de las células B[89].

Reorganizaciones en su localización cromosómica también se han relacionado con el desarrollo de tumores en humanos[295].

RasGRP4, se aisló como un gen implicado en leucemias mieloides en ratón[385] y su locus también está vinculado con la aparición de tumores en humanos. Presenta numerosas variantes de expresión y algunas de ellas han sido directamente relacionadas con el desarrollo de leucemias o procesos asmáticos[282,544].

RELEVANCIA DE LA SEÑALIZACIÓN POR DIACILGLICEROL EN LINFOCITOS

Los linfocitos a lo largo de su vida han de aprender a diferenciar entre las numerosas señales a las que están expuestos en función de su intensidad, su combinación y el momento en que se producen y por esto disponen de toda una serie de sistemas que les permiten distinguir entre estas variables. Pero para que estos sistemas sean efectivos han de estar muy regulados y además de las proteínas efectoras específicas, implicadas en la respuesta, deben existir otras encargadas de modular su actividad.

Si consideramos este esquema en el caso de la señalización por DAG encontramos en primer término las proteínas que responden al estímulo generando DAG. Son fundamentalmente PLC y PLD que presentan formas específicas de células linfocitarias como PLCβ2[221] y PLCγ2[382] o cuya expresión está muy regulada a lo largo del desarrollo del linfocito como PLD1 y PLD2[328]. En este último caso, estas proteínas tienen un patrón de expresión diferencial en linfocitos T, siendo muy abundantes en los timocitos y bajando sus niveles hasta ser prácticamente indetectables en células periféricas. Sin embargo, algunas líneas celulares como Jurkat recuperan parcialmente la expresión fundamentalmente de PLD2 y expresan otra actividad PLD que responde a estímulo, que probablemente corresponda con la activada por oleato[240,457].

En segundo término, los linfocitos presentan moléculas efectoras específicas como RasGRP[115] o quimerinas[440]. Además las proteínas reguladas por DAG con una expresión más ubicua como PKC o PKD desarrollan precisamente en este sistema unas funciones diferentes. En el caso de PKC, PKCβ y PKCθ a través del control de la vía de NFκB, uno de los efectores comunes de PKC, regulan la maduración de células B y T respectivamente[272,372,464]. Además las PKC van a permitir un control aún más riguroso de la señalización ya que pueden regular por fosforilación a otras proteínas que a su vez son activadas por DAG, como RasGRP[554]. En el caso de PKD aunque con funciones genéricas como la regulación del tráfico vesicular o la respuesta a estrés oxidativo, en linfocitos se sitúa en el inicio de cascadas que van a ser esenciales para la diferenciación de los timocitos[316,322].

En el último nivel, regulando la concentración de DAG para controlar la señalización en términos de intensidad y duración, en los linfocitos se ha descrito la participación de las DGK, concretamente DGKα y DGKζ cuya expresión está regulada a lo largo de la diferenciación y activación de las células T[362,417,555].

Este control tan riguroso va a permitir a los linfocitos desarrollarse correctamente ya que la eliminación por recombinación homóloga de algún elemento de cualquiera de los tres niveles: producción[221], respuesta[89,108,272,325,333,372,374,464] o degradación[556], conduce a fallos tanto en la diferenciación como en el desarrollo posterior de la respuesta inmune.

Considerando todos estos aspectos nosotros hemos centrado nuestro estudio en cuáles son los mecanismos por los que se regulan los niveles de DAG en respuesta a la estimulación. Los más firmes candidatos en este sentido son las DGK y por esto hemos centrado nuestro trabajo en estudiar los efectos de la desregulación de su actividad. Para poder analizar la cinética de producción y degradación de DAG en estas condiciones y en células intactas también son necesarios unos biosensores y por lo tanto nuestro segundo objetivo ha sido comprobar si los dominios C1, que permiten a las proteínas que los contienen responder a DAG, podrían convertirse en una herramienta que cumpliese esta función. Finalmente, nos hemos planteado estudiar más en detalle cuál es el mecanismo mediante el que uno de estos dominios es capaz de participar en la activación de RasGRP1 y por lo tanto establecer también la relevancia de DAG en este proceso. Además esto nos permitiría avanzar en el estudio del control de la vía de Ras en células linfoides que está íntimamente relacionada con la diferenciación tímica[465] y por lo tanto, una vez más, con la modulación de la intensidad de la señal.

OBJETIVOS

A lo largo del desarrollo experimental de esta tesis hemos intentado incorporar más datos al esquema general del DAG y su regulación usando como modelo de trabajo, en la mayoría de los casos, los linfocitos, su activación y su proliferación. En este sentido hemos centrado nuestro trabajo en tres puntos fundamentales:

A) ¿QUÉ CONSECUENCIAS TIENE ALTERAR LA ACTIVIDAD DE UNA ENZIMA QUE REDUCE LOS NIVELES DE DAG?

Buscar nuevos efectores de DAG o PA en modelos, tantos celulares como animales, donde se modifican sus niveles por la expresión de mutantes de DGK.

B) ¿DÓNDE, CUÁNDO Y DURANTE CUÁNTO TIEMPO SE ACUMULA DAG EN LA CÉLULA?

Generar biosensores que permitan estudiar la distribución y la cinética de producción y degradación de DAG en células intactas.

C) ¿QUÉ PAPEL JUEGA EL DAG EN LA REGULACIÓN DE PROTEÍNAS QUE CONTIENEN UN DOMINIO C1?

Estudiar el mecanismo de activación y translocación de RasGRP1.

MÉTODOS

ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO CON DGKα

Generación de las construcciones necesarias y amplificación de la librería. Tanto DGKα como Δ196DGKα, ambas de origen porcino, se subclonaron en pGBT8 (Clontech), vector que permite la expresión de estas proteínas fusionadas al dominio de unión a ADN del factor de transcripción GAL4. La resistencia del vector para permitir su amplificación en bacterias es ampicilina y su presencia en levaduras permite el crecimiento en ausencia de Trp.

La dos librerías comerciales utilizadas (Clontech HL4021AB y HL4015AB) están clonadas en pGAD10, vector con resistencia a ampicilina y que en levaduras permite el crecimiento en ausencia de Leu.

La librería HL4015AB fue amplificada en el laboratorio siguiendo los protocolos establecidos por la casa comercial. Brevemente: se generaron bacterias electrocompetentes DH5α y se transformaron con la cantidad de librería necesaria teniendo en cuenta varios factores: la eficiencia de transformación de las bacterias, el número de clones independientes de la librería original y la necesidad de que cada clon esté representado al menos una vez. Estas bacterias se crecieron en 300 placas de 150mm de diámetro en presencia de ampicilina hasta observar un crecimiento uniforme sobre toda la superficie. En ese momento se recogieron todas las colonias en LB con 25% glicerol y se separó 1/3 de todo el volumen para proceder a la extracción del ADN plasmídico por lisis alcalina y posterior purificación en gradientes de $CsCl_2$. Como control del proceso de amplificación, parte del material obtenido se digiere con EcoRI, que permite la liberación de lo diferentes insertos, y se analiza en geles de agarosa para compararlo con la librería original. Además se transforman bacterias con distintas diluciones de la librería amplificada para comprobar su título.

Transformación de la cepa HF7c con el cebo y posterior lisis. Una vez verificado el fenotipo de la cepa HF7c (no hay crecimiento en ausencia de Trp, Leu o His) se crecen en medio completo (YPD, según protocolos de Clontech) a 30ºC y con agitación hasta que el cultivo alcanza una $DO_{\lambda=600}$ superior a 1,5 (aproximadamente 12-16h). En ese momento se diluyen con medio atemperado hasta una $DO_{\lambda=600}$ en torno a 0,2 y se mantiene el crecimiento hasta que se encuentre en torno a 0,5 (2-3h). El cultivo se centrifuga y las levaduras se resuspenden en H_2O para volver a centrifugar. Las levaduras resultantes se recuperan en un volumen 30 veces menor al del cultivo original en una solución TE/LiAc (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 7,5/ 100mM acetato de litio, pH 7,5). Se retiran 100µl de levaduras que se incorporan a un tubo de 1,5 ml que contiene la mezcla de transformación: 100ng del vector de interés (pGBT8, pGBT8-Δ196DGKα o pGBT8-DGKα), 100µg de un ADN que facilita la entrada del plásmido ("*herring testes carrier DNA*") y polietilenglicol (PEG) al 40% (v/v) en TE/LiAc. Todos estos componentes se mezclan bien y se incuban 30min a 30ºC con agitación. Se añaden entonces 70µl de DMSO, se mezcla y se mantiene 15min a 42ºC. Pasado este tiempo los tubos se enfrían en hielo durante 2min y posteriormente se centrifugan para resuspender en el volumen necesario de TE para añadir sobre las placas de medio mínimo sin Trp (SD-Trp, según protocolos de Clontech). Las placas se incuban a 30ºC hasta la aparición de colonias.

Para analizar la expresión de las construcciones se selecciona un clon de cada tranformación y se crece en medio líquido SD-Trp a 30ºC con agitación durante 12-18h. La velocidad de crecimiento de los clones que expresan los cebos en comparación con los que sólo portan el vector vacío es indicativa de la toxicidad o no del cebo en estudio.

Transcurrido el tiempo de cultivo se mide la $DO_{\lambda=600}$ y el resultado multiplicado por un factor de 3,25 nos da aproximadamente la concentración de levaduras en mg/ml. Se recoge el volumen necesario para 40mg de levadura y se centrifuga. Tras retirar el sobrenadante, las levaduras se lavan con 1ml de H_2O y se congelan en hielo seco y se mantienen 20min a -20ºC. Pasado este tiempo el contenido del tubo se resuspende, con ayuda del vortex, en tampón de carga 2x y se vuelve a congelar durante 1min. Estos dos pasos se repiten 4 veces y después la mezcla se mantiene 5min a 98ºC se centrifuga y una parte del sobrenadante resultante se analiza por electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras y posterior WB e inmunodetección con anticuerpos específicos contra DGKα.

Transformación de la librería sobre levaduras que expresan el cebo. El protocolo de transformación es similar al expuesto en el apartado anterior. Las levaduras que expresan pGBT8-Δ196DGKα se crecen en 150ml SD-Trp hasta alcanzar la $DO_{\lambda=600}$ requerida. Tras la dilución hasta 1l con SD-Trp atemperado el cultivo se mantiene a 30ºC con agitación hasta superar una $DO_{\lambda=600}$ de 0,4. Se recoge y se centrifuga para hacer un lavado con 500ml de H_2O. Las levaduras, una vez retirado el sobrenadante, se resuspenden en 8ml de TE/LiAc y se añaden 500µg de librería y 20mg de ADN que colabora en la transformación ("*herring testes carrier DNA*"). Se mezcla bien y se incorpora a una solución de PEG al 40% (v/v) en TE/LiAc. Se incuba 40min a 30ºC con una agitación ligera y pasado este tiempo se añaden 7ml de DMSO. Tras mezclar la solución lentamente se mantiene a 42ºC 15min y posteriormente se enfría en hielo durante 1 o 2min. Se centrifuga y las levaduras se resuspenden en el volumen necesario de TE para poder distribuirlas en 50 placas de 150mm de diámetro de medio restrictivo SD-Trp/-Leu/-His (según protocolos de Clontech) con la concentración de 3-aminotriazol (3AT) necesaria y en 1 placa de SD-Trp/-Leu como control de transformación.

Análisis de clones positivos. Los clones que crecen en el medio restrictivo se aíslan y crecen de forma independiente en nuevas placas de SD-Trp/-Leu/-His. Si continua el crecimiento se recogen, uno por uno, para obtener el plásmido de la librería que contiene cada uno de ellos. Brevemente, cada clon se crece en medio líquido SD-Trp/-Leu hasta obtener un cultivo con una $DO_{\lambda=600}$ superior a 1-1,2. Las levaduras se centrifugan para retirar el medio y se lisan en una mezcla de 200µl de tampón de lisis (2% TritonX-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris pH 8, 1mM EDTA) y 200µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1 v/v/v) con ayuda del vortex y unas esferas de cristal (425-600µm Sigma) que rompen la membrana de la levadura. Se centifuga y al sobrenadante resultante se le añade 2,5v de etanol y 1/10v de acetato sódico 3M pH 5,2. Se mantiene en hielo 10min y se centrifuga a máxima velocidad durante 1min. Se lava con etanol al 70% y una vez secado, el ADN obtenido se resuspende en H_2O. Este ADN se utiliza para transformar por electroporación bacterias mutantes para *leuB* que se crecen en un medio restrictivo M9 (según protocolos de Clontech) con ampicilina, de tal forma que sólo podrán crecer aquellas bacterias que, gracias a la presencia del plásmido pGAD10, puedan complementar la mutación en la ruta de síntesis de leucina. Por lo tanto, al final del proceso de cada clon de levaduras positivo obtenemos una placa con colonias de bacterias, de las que se aíslan entre 5 y 10 en función del número total de colonias; se extrae su ADN plasmídico usando los productos correspondientes de Qiagen, se digiere con EcoRI y todos aquellas plásmidos obtenidos a partir de un clon de levaduras con un patrón de restricción diferente se secuencian con un oligo que se encuentran en la región 5´ de la región de clonaje: TAC CAC TAC AAT GGA TGA TG o con otro en la región 3´ GGT GCA CGA TGC ACA GT.

Se comprueba también si las colonias que continúan su crecimiento en medio restrictivo (SD-Leu/-Trp/-His) son positivas para actividad βgalactosidasa. Brevemente, se crecen los clones de levaduras de interés sobre filtros de papel Whatman y una vez que los clones han crecido lo suficiente los filtros se congelan por inmersión en nitrógeno líquido permitiendo la rotura de las levaduras y, una vez atemperados, se depositan en una solución de tampón Z (16,1g/l $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 5,5g/l $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0,75g/l KCl, 0,246g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ pH 7) que incluye, por cada 100ml de tampón, 0,27ml de βmercaptoetanol y 1,67ml de sustrato X-Gal 20mg/ml (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido en dimetilformamida). Los filtros se incuban a 30ºC, un máximo de 12h, para detectar la aparición del color azul característico de la actividad βgalactosidasa.

El ADN plasmídico de aquellas colonias que continúan creciendo se utiliza para cotransformar las levaduras HF7c con pGBT8-Δ196DGKα y cada uno de ellos y comprobar, de nuevo, si hay crecimiento en condiciones restrictivas. La cotransformación se lleva a cabo tal como hemos descrito para un solo plásmido, añadiendo, en este caso, 100ng de cada vector.

ENSAYO DE ACTIVIDAD AKT

Cultivo, transfección transiente y estimulación de células Bafβwt. Las células Bafβwt se mantienen en cultivo en medio RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS), 2mM glutamina, 50nM βmercaptoetanol y 50U/ml de interleuquina-2 (IL2) recombinante. Para su expansión, en lugar de IL2, el medio se suplementa con 10% de sobrenadante de células Wehi3B que aporta la interleuquina-3 (IL3) necesaria para el crecimiento. Para la transfección, por punto, se recogen $10x10^6$ células y se resuspenden en 675µl de medio sin suero y atemperado. Sobre esta suspensión, ya en las cubetas de electroporación, se añaden los plásmidos de interés (pSG5, pSG5-HA-AKT, pSG5-p110-CAAX, pEF-EGFP-DGKα o pEF4-Myr-GFPDGKα) manteniendo siempre la misma cantidad total de ADN y el menor volumen posible. El electrochoque se realiza a 304v y 975µF y las células se recuperan en 30ml de medio completo con IL3.

Para poder realizar la privación del factor de crecimiento y en los casos requeridos la posterior estimulación, se recogen las células necesarias y se lavan 3 veces con medio sin suero ni IL3 para posteriormente mantenerlas en RPMI con BSA 1% durante 4h. En los casos necesarios se incorporó R59949 (10µM) las dos últimas horas. Para proceder a la estimulación las células se mantendrán a una concentración máxima de $5x10^6$ y se estimulan con IL2 (50U/ml) según los tiempos indicados en cada condición.

Ensayo de actividad AKT y detección de pSerAKT. Las células, tratadas tal como se indica en el apartado anterior, se resuspenden en tampón de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP40, 150mM NaCl, 10mM NaF, 10mM $Na_4P_2O_7$, 1mM Na_3VO_4, 1mM PMSF y 10µg/ml de aprotinina y leupeptina) y se mantienen a 4ºC 15min. Se centrifuga a 15000*x*g (4ºC 15min) y el sobrenadante se cuantifica para ajustar la cantidad de proteína ("*DC protein assay*", BioRad) y separar una parte para los controles de carga y otra para poder inmunoprecipitar la proteína AKT usando un anticuerpo contra HA, el epítopo que porta la construcción. La inmunoprecipitación se realiza a 4ºC durante 90min, manteniendo los tubos en continuo movimiento en la noria. Pasado este tiempo se incorpora la γ-sefarosa y se incuba 1h en la noria a 4ºC. Posteriormente se realizan una serie de lavados: 2 con tampón de lisis, 2 con un tampón de LiCl (0,5M LiCl, 100mM Tris-HCl pH 8 y 1mM EDTA pH 8) y 2 con tampón de ensayo de actividad AKT (50mM Tris-HCl pH 7,4, 10mM $MgCl_2$). En el último lavado se separa, cuando se indica, una proporción para analizar la fosforilación en Ser 473 de AKT y el resto se usará para llevar a cabo el ensayo quinasa. Sobre la proteína, unida a la γ-sefarosa, se incorpora tampón de ensayo de actividad AKT, DTT (1mM concentración final), histona2b (H2b, 2,5µg por reacción), ATP (50µM, concentración final) y [γ-^{32}P]ATP (5µCi por reacción) y se deja que la reacción se desarrolle durante 30min a 37ºC hasta pararla añadiendo tampón de carga 5x. Las muestras así obtenidas se analizan en un gel de acrilamida al 13,5% que se corta en dos partes. La mitad inferior, que contiene la H2b, se tiñe con azul de Coomassie y se fija con solución de fijación (H_2O:ácido acético:metanol 8:1:4 v/v/v) y se seca para detectar la proteína fosforilada por autoradiografía. La mitad superior se transfiere a una membrana de nitrocelulosa para detectar, con anticuerpos específicos contra HA, la cantidad de proteína AKT inmunoprecipitada en cada condición. Por otro lado los controles de carga y la proteína inmunoprecipitada, separada para detectar su fosforilación, se analizan también por SDS-PAGE en condiciones reductoras y posterior WB e inmunodetección con anticuerpos específicos, contra pSer473AKT en el caso del estudio de la fosforilación, y contra GFP para comprobar la presencia de las construcciones de DGKα. La membrana utilizada para detectar la fosforilación se incuba posteriormente con anticuerpos específicos contra AKT total para comprobar la cantidad de proteína en cada condición. En el caso de los ensayos en presencia de R59949, las muestras se lisan y procesan de la misma forma para detectar la fosforilación de AKT endógeno.

HERRAMIENTAS Y MÉTODOS UTILIZADOS PARA ESTUDIAR CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA CELULAR

Cultivo, transfección transiente y estimulación de células PAE. Las células PAE se mantienen en cultivo en medio F12HAM suplementado con 10% de suero. Para su transfección son necesarias $10x10^6$ células por punto que se recogen a partir de un cultivo que no supere el 70% de confluencia. Se resuspenden en 500µl de medio completo frío y se incorporan en cubetas de electroporación previamente enfriadas y que se mantienen en hielo durante todo el proceso. Se añaden los plásmidos necesarios según se indique (pEF-EGFP, pEF-EGFP-DGKα, pEF-EGFP-Δ196DGKα, pEF4-MyrGFPDGKα o pCMV3-EE-RacV12) y se procede a realizar el electrochoque a 250v y 950µF. Las células se recuperan en 30 ml de medio completo y se crecen sobre distintas superficies según las necesidades del ensayo:

sobre placas convencionales para los ensayos bioquímicos, sobre cubreobjetos para poder realizar inmunofluorescencias o sobre cámaras pretratadas con fibronectina (5µg/ml en PBS 12h a 4ºC) para observar las células intactas por microscopía confocal.

Para la estimulación con PDGF (50ng/ml a partir de un stock 1000x en ácido acético 1M y 2mg/ml BSA libre de ácidos grasos) las células se lavan dos veces y se mantienen en condiciones de privación de suero y en presencia de BSA libre de ácido grasos 0,5% durante 10-12h. Pasado este tiempo, se añade el estímulo y, a excepción de los estudios de videomicrocopía, a los 12min las células o bien se fijan o en el caso de los ensayos de bioquímica se retira el medio y se añade PBS frío y las placas se depositan sobre nieve carbónica para recoger las células, rápidamente, usando rascadores.

Tinción de las fibras de estrés con RD-faloidina. Las células tratadas tal como se indica en el apartado anterior se fijan en PFA4% (en PIPES 100mM pH 6,8, EGTA 2mM, $MgCl_2$ 2mM y algunas gotas de KOH 5M para facilitar la disolución) durante 10min a temperatura ambiente. Se lavan tres veces con Tris-HCl 150mM pH 7.4 y se permeabilizan con 0,2% TritonX-100 en PBS (10min a temperatura ambiente). Se lava con PBS y se añade la faloidina-RD en PBS durante 10-20min. Se lava tres veces con PBS y las muestras se montan para su observación en el microscopio confocal. Las imágenes obtenidas se procesan con el programa ImageJ.

Ensayo de actividad DGK. Las células transfectadas o no y estimuladas o no con PDGF se lisan en un tampón hipotónico (10mM Tris-HCl pH 7,4, 50mM NaF, 1mM Na_3VO_4, 1mM PMSF y 10µg/ml de aprotinina y leupeptina) con ayuda de jeringas de 30G. Se centrifuga a baja velocidad para retirar los núcleos y los sobrenadantes se cuantifican para poder separar una parte para el ensayo de actividad en lisado total y otra para detectar la expresión de las proteínas de interés. En el caso de actividad sobre los inmunoprecipitados la lisis se lleva a cabo en presencia de detergente (50mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP40, 150mM NaCl, 10mM NaF, 10mM $Na_4P_2O_7$, 1mM Na_3VO_4, 1mM PMSF y 10µg/ml de aprotinina y leupeptina) durante 15min a 4ºC; se centrifuga a 15000*x*g (15min 4ºC) y el sobrenadante se cuantifica para proceder a la inmunoprecipitación con un anticuerpo específico contra GFP (90min a 4ºC en la noria). Tras la incubación con γ-sefarosa (1h 4ºC en la noria) los inmunoprecipitados se lavan dos veces con tampón de lisis, 1 vez con 0,5M LiCl en 10mM Tris-HCl pH 7,4 y 3 con 10mM Tris-HCl pH 7,4. En este último paso se separa una parte de la γ-sefarosa para detectar la cantidad de proteína y otra parte para el ensayo de actividad.

Bien sobre los lisados totales o bien sobre la γ-sefarosa se añade 10µg de C8-DAG por punto. El C8-DAG se obtiene a partir de un stock en cloroformo que ha de evaporarse en una atmósfera de N_2 para resuspender el lípido resultante en 10mM Tris-HCl pH 7,4 por sonicación. Esta mezcla se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente incorporar los componentes necesarios para el ensayo: en 10mM Tris-HCl pH 7,4, ATP (20µM concentración final), $MgCl_2$ (10µM concentración final) y [γ-^{32}P]ATP (10µCi por reacción). La reacción se desarrolla durante 10min a temperatura ambiente y se para al añadir 1M HCl:MeOH:$CHCl_3$ (1:2:4 v/v/v). Se agita con fuerza y tras centrifugar a máxima velocidad 30s se recoge la fase inferior que contiene los lípidos. Se lava con 100µl de 1M HCl:MeOH (1:1 v/v) y se recoge la fase de abajo y se seca completamente para resuspender los lípidos resultantes en una mezcla $CHCl_3$:MeOH (1:1 v/v) que se aplica sobre placas de cromatografía en capa fina (TLC) con C8-PA como marcador de la migración del lípido de interés. La TLC se desarrolla en una solución de $CHCl_3$:MeOH:4M Amonio (9:7:2 v/v/v) y se detecta la presencia de C8-PA mediante autoradriografía.

La cantidad de proteína transfectada o endógena en el lisado total o la inmunoprecipitada en cada caso se analizó por SDS-PAGE en condiciones reductoras con posterior WB e inmunodetección con anticuerpos específicos contra DGKα.

Videomicroscopía de células PAE en respuesta a PDGF. Las células PAE transfectadas tal como se indica en el primer apartado de esta sección, se mantienen en cultivo sobre cámaras de microscopía recubiertas con fibronectina y un día después de la transfección se les retira el suero durante 10h y pasado este tiempo se llevan al microscopio confocal donde manteniendo la temperatura a 37ºC se estimulan con PDGF y se capturan imágenes cada 30s. Las imágenes se procesan con el programa ImageJ.

Inmunodetección de paxilina en células PAE. Las células se procesan tal como se indica en el apartado que explica la tinción de las fibras de estrés con algunas diferencias. En este caso tras la permeabilización, las células se bloquean con una solución de 1% BSA en PBS durante 30min. Se lavan 3 veces con PBS y el anticuerpo α-paxilina se incuba a temperatura ambiente 1h en PBS; se lava 3 veces con PBS en presencia de 0,1% Tween-20. Se añade el anticuerpo secundario conjugado con Cy3 en una solución de PBS y se incuba 1h a temperatura ambiente. Se lava tres veces con PBS con 0,1% Tween-20 y las muestras se montan para proceder a su observación en el microscopio confocal. Las imágenes se procesan usando el programa ImageJ.

Generación de las contrucciones necesarias para la expresión heteróloga en *Dictyostelium discoideum*. Se usaron las construcciones disponibles en el laboratorio de DGKα y MyrGFPDGKα, ambas de origen porcino, para proceder a su

clonación en pDXA, vector que permite la expresión en *D. discoideum* bajo el control del promotor de actina15.

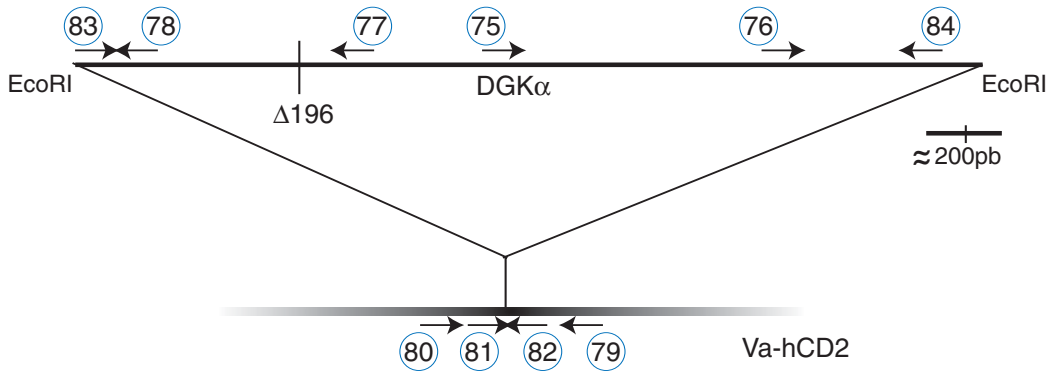
Cultivo de *D. discoideum* y generación de estables para la expresión heteróloga de las construcciones de interés. Las células de *D. discoideum* de la cepa AX4 crecen a 22ºC con agitación en el medio enriquecido HL5 (para 800 ml: 11,2g de triptona, 5,6g de extracto de levadura, 0,28g de Na_2HPO_4, 0,96g de KH_2PO_4, pH final entre 6-6,5; se esteriliza y se añaden 90g de glucosa en 50ml de H_2O y penicilina-estreptomicina). Para la transformación son necesarias $5x10^6$ células por punto que se resuspenden en tampón H-50 (20mM Hepes pH 7, 50mM KCl, 10mM NaCl, 1mM $MgSO_4$, 5mM $NaHCO_3$, 1mM NaH_2PO_4) frío y se lavan dos veces manteniendo las células en todo momento a 4ºC. Tras los lavados las células se resuspenden en 100µl de H-50 y se añaden a la cubeta de electroporación donde se incorpora el plásmido correspondiente (pDXA, pDXA-DGKα, pDXA-MyrGFPDGKα), entre 5 y 10µg. El electrochoque se realiza a 850v y 25µF y después las células se mantienen en hielo 5 minutos para posteriormente recuperarlas en medio completo HL5 en presencia de G-418 (10µg/ml) para permitir la selección. Las células se mantienen a 22ºC hasta que después de unos días aparecen colonias resistentes en la placa que se recogen y disgregan para contar el número de células y hacer diluciones seriadas que nos permitan aislar, en cultivo no axénico sobre placas de *Kleibsella aerogenes*, clones independientes. Al cabo de unos días se podrán observar sobre las placas pequeñas regiones donde no hay bacterias que corresponden con la zona de crecimiento de cada clon de *D. discoideum*. Sobre cada región se recoge con una punta de pipeta una pequeña fracción de cultivo que se añade a un tubo de 1,5ml con 20µl de agua, se hierve durante 10min y un 1µl se usará para analizar, por PCR con oligonucleótidos específicos contra DGKα (FigM1), la presencia de las construcciones. Aquellos clones que sean positivos se aíslan y crecen de nuevo sobre placas de *K. aerogenes* para que cuando hayan alcanzado un tamaño apropiado poder crecerlos en medio HL5 con G418 y poder mantener el cultivo y congelar los clones de interés para su conservación.

Análisis de la expresión de las construcciones de DGKα en *D. discoideum*. Se recogieron células, tanto de los clones seleccionados para cada construcción como del conjunto previo a la selección sobre placas de *K. aerogenes* y se lisaron en tampón de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP40, 150mM NaCl, 10mM NaF, 10mM $Na_4P_2O_7$, 1mM Na_3VO_4, 1mM PMSF y 10µg/ml de aprotinina y leupeptina) durante 15min en hielo. La proteína resultante después de la centrifugación a 15000*x*g se analizó por SDS-PAGE en condiciones reductoras y posterior WB e inmunodetección con anticuerpos específicos para DGKα.

GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS

Obtención de las construcciones necesarias. Construcciones tanto de Δ196DGKα como de DGKαinactivo, de origen porcino, se usaron como base para clonar la secuencia de ambas proteínas en el vector de transgénesis Va-hCD2. El clonaje se realiza por restricción y posterior ligación en la diana EcoRI del vector de destino. Como resultado la secuencia codificante para DGKα, en cualquiera de sus dos versiones, queda flanqueada en el extremo 5´ por el promotor de hCD2 y en el extremo 3´ por la región LCR y dos señales de poliadenilación. Para permitir la amplificación en bacterias todo el conjunto está insertado en pBlueScript de tal forma que tras cortar con las enzimas SalI y NotI se libera un fragmento de aproximadamente 12,8 kb para Va-hCD2Δ196DGKα y 13,5 kb para Va-hCD2DGKαinactiva. Para obtener suficiente cantidad de ADN para proceder a la microinyección, se digiere cada una de las construcciones y el resultado se resuelve en geles de agarosa y tras cortar la banda de interés, se obtiene el ADN por electroelución. Brevemente, las bandas se introducen en tripas de diálisis con TAE para que en presencia de una corriente eléctrica el ADN pase de la agarosa al TAE de la tripa. El ADN, así obtenido, se lava tres veces con un volumen de fenol y otras tres con un volumen de éter y se deja precipitando a -20ºC durante unas horas en presencia de etanol y acetato sódico (0,3M concentración final). El ADN resultante se lava con etanol al 70%, se deja secar y se resuspende en TE (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA), se cuantifica y se dializa para proceder a la microinyección tras comprobar su integridad en geles de agarosa y secuenciar la región codificante.

Análisis de la presencia del transgén por PCR. Para poder comprobar la presencia del transgén en los miembros (se numeran y marcan de 1 en adelante) de cada camada de las distintas microinyecciones se procesan pequeños fragmentos de colas para poder obtener ADN genómico y comprobar si hay integración del transgén. Las colas se procesan siguiendo los protocolos indicados en el sistema de Invitrogen "*Easy-DNA*" y el ADN obtenido se utiliza como sustrato para sucesivas reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos para detectar los transgenes (FigM1) y con una pareja de oligonucleótidos que permiten amplificar una porción de ADN genómico de tal forma que sirve de control de la extracción de ADN; TSH5´: TCC TCA AAG ATG CTC ATT AG y TSH3´: GTA ACT CAC TCA TGC AAA GT. Para llevar a



75	TGG AAA TTC CAG TAT CTA
76	TGA CAA GCG CCT GGA AGT A
77	CAT GTG TTT GGA CAC CAA TG
78	AGG CTT AGG TGA CTA GGA A
79	CCA CAT GGC TGA GTT CGA AGA TG
80	CAT GAA GAG CTC AGA ATC AAA AGA
81	GTG CAG TCT CCA AAG AAT TC
82	CCC GGG TAC GTA GAA TTC
83	AAG ATG TCC AAG GAG AGG G
84	GGG TAT TAC ACT CCC CTG

Figura M1 – Oligonucleótidos específicos para DGKα y Va-hCD2 utilizados para el análisis por PCR de los transgénicos. Se indican con flechas la posición y orientación que ocupan cada uno de los oligonucleótidos utilizados, tanto en la región codificante para DGKα (línea superior) como en las proximidades de la región de clonaje del vector Va-hCD2 (línea inferior difuminada). Se indica con una línea vertical la posición del ATG en el caso de Δ196DGKα. En la tabla la secuencia específica de cada uno de los oligonucleótidos numerados de 75 a 84.

cabo el análisis de la descendencia de los individuos positivos y posibles fundadores, se sigue el mismo sistema (se numeran de 1 en adelante indicando con letras, en orden alfabético, la generación).

Análisis de la presencia del transgén por Southern blot. Se seleccionan varios individuos de la primera generación descendiente del fundador para determinar el número de integraciones y el número de copias integradas. Se procesan los fragmentos de cola tal como indicamos en el apartado anterior y se comprueba la integridad del ADN genómico obtenido, en geles de agarosa. Se cuantifican las muestras y se digieren con EcoRI que además de cortar en distintas zonas del ADN genómico liberará la región codificante del transgén. Las muestras así procesadas se precipitan y se recuperan en TE para poder separar los distintos fragmentos en geles de agarosa al 0,7%; en paralelo se utilizan marcadores de peso molecular para establecer los tamaños de las bandas de interés y un rango entre 1 y 10 pmoles de ADN que corresponde con la región codificante para, al comparar la intensidad de su señal radiactiva con la del transgén integrado, se pueda establecer, aproximadamente, el número de copias incluidas en el genoma de cada individuo. Los geles se desnaturalizan (10min en 0,15M HCl; 30min en 0,2M NaOH y 0,6M NaCl; 30min en 0,5M Tris-HCl pH 7,6, 1,5M NaCl) antes de proceder a la transferencia a membranas de nylon por capilaridad. Una vez finalizada la transferencia las membrana se lava unos minutos en 2xSSC y el ADN se fija por exposición a UV durante 1min.

Se genera la sonda por PCR usando como molde los plásmidos originales de transgénesis y los oligos 79/80 (FigM1). Se marca con [α-^{32}P]dCTP siguiendo el protocolo de "*Prime It II*" (Stratagene) y se purifica con las columnas "*Micro Bio-Spin 30*" (Bio-Rad).

La membrana se prehibrida en "*ExpressHyb*" (Clontech) en presencia de ADN de testículo de salmón desnaturalizado, durante 1h a 60ºC. Se incorpora la sonda a una mezcla de SSC (2x final en la solución de hibridación) y ADN de testículo de salmón, se desnaturaliza y se añade a la solución de hibridación ("*ExpressHyb*" a 65ºC) que se cambia por la de prehibridación para realizar la incubación a 65ºC durante 12h. Pasado este tiempo se realizan los lavados: 2 de 15min a temperatura ambiente en 2xSSC 0,1% SDS y los necesarios de 15min a 65º con 1xSSC 0,1% SDS para que disminuya la señal inespecífica. Las membranas se exponen y las autoradiografías resultantes se analizan para determinar el patrón de bandas y en los casos necesarios cuantificar su intensidad.

Análisis de la expresión del transgén por WB y ensayos de actividad. Se seleccionan varios ratones de la primera generación, tanto positivos como negativos en el análisis por PCR, y el fundador de la línea. Se sacrifican y se extrae, de cada uno de ellos, el bazo, ganglios inguinales y axilares y el timo. Estos órganos se disgregan en PBS y la suspensión celular resultante, en el caso del bazo, se trata con una solución de lisis de eritrocitos (para 1l: 2,06g Tris-base ajustado a pH 7,65 con HCl, y 7,47g NH_4Cl). Una vez que ya no se detectan eritrocitos, se cuentan las células en todas las muestras y se recogen en PBS las necesarias. Se centrifugan para proceder a su lisis en tampón hipotónico y analizar tanto la expresión de la proteína con un anticuerpo específico contra DGKα, que no reconoce la proteína de ratón, como la actividad DGK en lisado total. Se sigue el mismo protocolo que el descrito en "Ensayo de actividad DGK" en la sección anterior a excepción de la lisis que dado el pequeño tamaño de las células no se puede realizar con jeringas sino por varios ciclos de congelación y sonicación.

HERRAMIENTAS Y MÉTODOS UTILIZADOS PARA ESTUDIAR DAG EN EL INTERIOR CELULAR

Construcciones de los dominios C1 fusionados a GFP. Los dominios C1 se amplifican por PCR usando distintos plásmidos como molde. Para C1a, C1b y C1a+C1b de PKCθ, se usa PKCθ-EGFP de Clontech que codifica por la proteína de origen humano. Para C1 de RasGRP1, se utiliza un plásmido que codifica por la proteína de rata, cedido por J.C. Stone (Dept. Biochemistry, Univ. Alberta, Canada). Para el dominio C1 de β2Quimerina, se usa el plásmido pEF-EGFPβ2Quimerina, cedido por M.G. Kazanietz (Centre for Experimental Therapeutics, Univ. Pennsylvania, Philadelphia, PA). Los oligonucleótidos utilizados (FigM2A) se diseñan para poder amplificar los 50 residuos consenso de los dominios C1 junto con tres aminoácidos más, tanto en el extremo C- como N-terminal. Se incorporan además las dianas de las enzimas de restricción que permiten su clonaje en pEF-EGFP (modificado a partir de pEGFP, Clontech), que son EcoRI en 5´ y BamHI en 3´. Cada construcción contiene los siguientes residuos de las proteínas completas: C1aPKCθ: 156-212, C1bPKCθ: 229-284, C1a+C1bPKCθ: 156-284, C1RasGRP1: 540-596 y C1β2Quimerina 357-413.

Para obtener los mutantes pEF-EGFPC1bPKCθ 5V_E y +123GIN_KKR y pEF-EGFPC1RasGRP1 5E_V y +123KKR_GIN se utiliza el sistema "*QuikChange Site-directed mutagenesis kit*" de Stratagene; usando como molde las correspondientes construcciones de los dominios C1 y unos oligonucleótidos diseñados para, a la vez que se genere la mutación, aparezca o desaparezca una diana de restricción, lo que facilita el posterior análisis (FigM2B).

Para las transfecciones de las proteínas completas se usaron plásmidos con GFP: PKCθ-EGFP (Clontech) y pEGFPRasGRP1 (RasGRP1 de rata subclonada en pEGFP, Clontech).

Cultivo y transfección transiente de células Jurkat. Las células Jurkat se mantienen en DMEM suplementado con 10% de FCS y 2mM glutamina. Para su transfección se recogen $12x10^6$ por punto y se resuspenden en 400µl de medio completo atemperado, se incorporan a cubetas de electroporación, se añade 20µg de cada plásmido de interés (pEF-EGFP, pEF-EGFPC1β2Quimerina, pEF-EGFPC1aPKCθ, pEF-EGFPC1bPKCθ, pEF-EGFPC1a+C1bPKCθ, pEF-EGFPC1RasGRP1, pEGFP-RasGRP1 o PKCθ-EGFP) y el electrochoque se realiza a 270v y 975 µF. Las células se transfieren inmediatamente a 10 ml de medio completo y se mantienen en cultivo 24h antes de ser procesadas.

Microcopía confocal con células intactas. Las células Jurkat tras 24h desde la transfección se centrifugan y resuspenden en HBSS (25mM Hepes KOH pH 7,4, 1mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$, 132mM NaCl, 0,1% BSA). Se recogen y transfieren a cámaras recubiertas con poli-D,L-lisina y tras permitir que se adhieran se mantienen a 37ºC para llevar a cabo la captura de imágenes. En el caso de la adición de U73122 (1µM), las células se incuban en su presencia durante 30min antes de ser depositadas sobre las cámaras. Cuando se realizan grabaciones, el agente estimulante, PMA o PDBu (200 nM) se añade a la solución de HBSS tras capturar la primera imagen y se continua la captura a intervalos de 11s. En el caso del propranolol (250µM) se añade en las mimas condiciones y las imágenes se recogen cada 5s. Todas las imágenes se toman en un microcopio confocal y se analizan con el programa ImageJ.

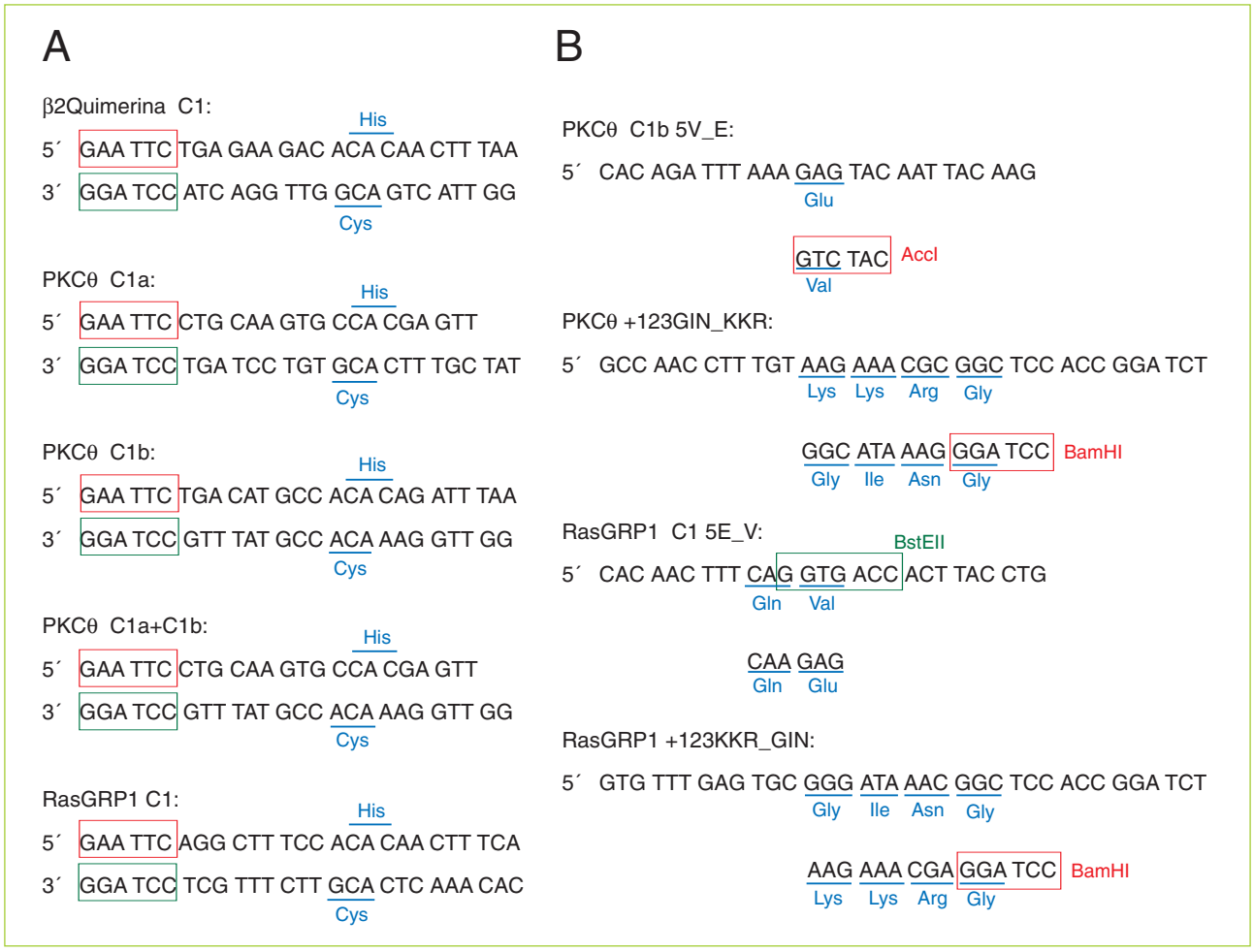


Figura M2 – Oligonucleótidos utilizados para la generación de las construcciones de los distintos dominios C1.

A - Oligonucleótidos diseñados para el clonaje de cada uno de los dominios C1 estudiados en pEF-EGFP, que permite la expresión de una proteína de fusión con GFP en el extremo N-terminal. Se indican con una línea azul los codones que codifican el primer (His) y último aminoácido (Cys) de los 50 que componen el dominio C1. Encuadrado en rojo la diana EcoRI y en verde BamHI añadidas para facilitar el clonaje con la pauta de lectura adecuada.

B - Oligonucleótidos diseñados para generar mutaciones puntuales en los dominios C1bPKCθ y C1RasGRP1. Se indica en cada caso (iniciando la secuencia con 5´), uno de los dos oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis y debajo la secuencia original que se muta. Con una línea azul se indican los codones que se mutan en cada caso y los aminoácidos por lo que codifican. En rojo las dianas de restricción que desaparecen cuando se produce la mutación y en verde las que aparecen.

Análisis de la expresión de las construcciones por WB. Las células tras 24 horas desde la transfección se resuspenden en tampón de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP40, 150mM NaCl, 10mM NaF, 10mM $Na_4P_2O_7$, 1mM Na_3VO_4, 1mM PMSF y 10µg/ml de aprotinina y leupeptina) y se incuban 15min a 4ºC. Tras la centrifugación (15000*x*g, 15 min, 4ºC), los sobrenadantes se analizan para establecer la concentración de proteína ("*DC protein assay*", BioRad) y una cantidad equivalente de cada muestra se analiza por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Las proteínas se transfieren a membranas de nitrocelulosa y la expresión se analiza con un anticuerpo específico contra GFP y con el sistema de detección de ECL.

Immunofluorescencia. Después de 24 desde la transfección las células se transfieren a cubreobjetos tratados con poli-D,L-lisina para permitir su adhesión (15 min), se fijan con PFA2% (10 min) y se lavan al menos tres veces con 150 mM Tris-HCl pH 7,4, se permeabilizan (10 min) con PBS 0,2% Triton X-100, se lavan una vez con PBS, se bloquean en PBS 1%BSA y se lavan tres veces con PBS. El anticuerpo primario que se indica en cada condición (anti-gigantinaα o anti-PDI) se incuba 1h, a temperatura ambiente y se lava tres veces con PBS 0,1% Tween-20. Los anticuerpos secundarios usados están conjugados con Cy3 para poder observar la tinción en paralelo a la expresión de las construcciones fusionadas a GFP. Las células se observan

en un microscopio confocal y las imágenes obtenidas se procesan usando el programa ImageJ.

Ensayo de unión a vesículas. Se preparan las mezclas de lípidos en las proporciones indicadas. En el caso de la simulación de membrana plasmática o nuclear POPC:POPE:POPS:POPI:colesterol 12:35:22:9:22 o 61:21:4:7:7 (mol:mol) respectivamente y para analizar la afinidad por distintas especies de DAG DPPC:PS 4:1 (mol:mol) con o sin DOG o SAG (2,5µM). Esta mezcla de lípidos, en cloroformo, se seca bajo una corriente de nitrógeno y a continuación se mantiene en vacío durante 2h. La mezcla, completamente seca se resuspende, con ayuda del vortex durante 50s, en tampón de unión (20mM Tris-HCl pH 7,5, 5mM $MgCl_2$, 200µM $CaCl_2$, 0,3mg/ml BSA) a una concentración final de 200µM lípido.

Las células Jurkat se transfectan con los distintos dominios C1 y se recogen 24h después. Se resuspenden en un tampón hipotónico frío (10mM Tris-HCl pH7,5, 10mM NaF, 1mM Na_3VO_4, 1mM PMSF y 10µg/ml de aprotinina y leupeptina) y se incuban en hielo 20min. Las células se lisan usando jeringas de 30G y tras 15 pases el homogenado resultante se centrífuga (15000*x*g, 15min) para retirar el núcleo y las células parcialmente rotas. Los sobrenadantes se recogen y se centrifugan (100000*x*g, 30min) para retirar las partículas que puedan interferir en el ensayo. Los sobrenadantes se analizan para determinar la cantidad de proteína y 100µg de proteína total se incuban con las vesículas generadas durante 15min a temperatura ambiente. Para aislar la proteína unida a la vesícula la mezcla se centrifuga a 100000*x*g 30min. El resultado de la centrifugación se analiza en geles de SDS-PAGE en condiciones reductoras. Los niveles de cada dominio C1 que se une las vesículas se analiza con un anticuerpo específico contra GFP.

Ensayo de FRAP ("Photorecovery after bleaching"). Las células Jurkat después de ser transfectadas con pEF-EGFPRasGRP1 se resuspendieron en HBSS y se transfirieron a cámaras recubiertas con poli-D,L-lisina. Una vez adheridas a la superficie se mantienen a 37ºC para llevar a cabo la grabación en el microcopio. En el ensayo de FRAP, se selecciona un área de la célula sobre la que incide el láser a máxima potencia y se analiza la recuperación de la señal de fluorescencia capturando imágenes cada 500ms. Las imágenes se tomaron en un microcopio confocal y se analizaron usando el programa ImageJ.

Estimulación con microesferas recubiertas de anticuerpos. Para pegar los anticuerpos sobre la superficie de las microesferas se incuban 0,5 x 10^6 durante 90min a temperatura ambiente con 1µg de anticuerpo (1:1 αCD3 y αCD28) en PBS en un volumen final de 1ml; pasado este tiempo se centrifuga y se retira el sobrenadante para añadir 1,5 ml de 1% BSA en PBS e incubar durante 30min. Las microesferas se lavan 3 veces con PBS y se resuspenden en PBS para conservarlas a 4ºC hasta su uso. Para la estimulación las células se mezclan con microesferas recubiertas de anticuerpos en una proporción 1:1 (células:microesfera). La mezcla se deposita sobre las cámaras recubiertas de poli-DL-lisina y se capturan imágenes cada 15s. Las imágenes se toman con un microcopio confocal y se analizan con el programa ImageJ.

Estimulación de células Jurkat con anticuerpos solubles. Para llevar a cabo la estimulación con anticuerpos solubles se recogen las células necesarias en crecimiento exponencial y en el caso de las células transfectadas con pEF-EGFP, pEF-EGFPC1a+C1bPKCθ o pEF-EGFPC1RasGRP1 previamente se aísla la población positiva para GFP y se comprueba su porcentaje de expresión tras 8h de cultivo. Para retirar el suero del medio y mantener las células en privación de suero se lavan 3 veces con DMEM y se crecen 1h en DMEM BSA 1%. En los casos indicados se incorpora durante los últimos 20min U73122 (1µM) y se mantiene esta concentración a lo largo de todo el ensayo. Pasado este tiempo las células se separan en tubos de 1,5ml (al menos uno por cada tiempo que se analice en el ensayo) a una concentración final de 1x10^6 células/ml en HBSS y se estimulan con αCD3 o αCD3+αCD28 (1µg/ml concentración final de cada uno). Las células se recogen a los distintos tiempos y se procesan para su análisis. En el caso de la detección de pERK se realiza una lisis convencional tal como se indica en el apartado "Análisis de la expresión de las construcciones por WB" de esta misma sección y se detecta la proteína fosforilada así como la proteína total usando los anticuerpo específicos αpThr202/αpTyr204ERK y αERK. Para el análisis de la carga con GTP de las proteínas Ras y Ral se sigue el protocolo indicado a continuación.

Detección de Ras-GTP y Ral-GTP. Las células obtenidas tal como indicamos en el apartado anterior se resuspenden en los siguientes tampones a los que se añaden los correspondientes inhibidores de proteasas y fosfatasas (10mM NaF, 1mM Na_3VO_4, 1mM PMSF y 10µg/ml de aprotinina y leupeptina). Para analizar Ral-GTP: 50mM Tris-HCl pH7,5, 200mM NaCl, 1%NP40, 10mM $MgCl_2$ y 0,5mM DTT y para detectar Ras-GTP: 25mM Hepes pH 7,5, 150mM NaCl, 1%NP40, 10mM $MgCl_2$, 1mM EDTA y 2% glicerol. Para favorecer el proceso de lisis se utilizan agujas de 25G (5 veces) y después de 30G (otras 5 veces). Los lisados obtenidos se incuban con glutation-sefarosa durante 10min a 4ºC y se centrifugan para retirar aquellos elementos que se unan inespecíficamente. Los sobrenadantes resultantes se cuantifican para separar alícuotas de lisado total que permitan analizar en paralelo la fosforilación de ERK y de AKT y el resto se incuban con las proteínas de fusión RBD(Raf)-GST o RBP(RalBP1)-GST unidas a glutation-agarosa, para detectar Ras-GTP o Ral-GTP respectivamente, (30min, 4ºC en la noria). Se centrifuga a máxima velocidad

unos segundos y después de varios lavados con los tampones de lisis correspondientes, se añade tampón de carga 5x y los niveles de Ras y Ral, unidos a las proteínas de fusión, se analizan por SDS-PAGE en condiciones reductoras más posterior WB e inmunodetección con anticuerpos específicos αRas y αRal. En paralelo se determina la cantidad de Ras y Ral en lisado total, a modo de control, y los niveles de pAKT y pERK usando los anticuerpos específicos: αpThr202/αpTyr204ERK y αpSer473AKT y los correspondientes controles de carga con anticuerpos contra la proteína total αERK o αAKT.

Herramientas y Métodos Utilizados para Estudiar la Regulación de RasGRP1

Construcciones de RasGRP1 y p85. Para la expresión de la proteína silvestre se utilizan dos vectores, uno que permite la expresión de la proteína de rata fusionada a GFP (pEGFP-RasGRP1) y otro sin GFP (pEFbosCX-RasGRP1). Las mutaciones realizadas se generan sobre el vector pEGFP-RasGRP1 usando el sistema "*QuikChange Site-directed mutagenesis kit*" de Stratagene y unos oligonucleótidos específicos para cada mutación que permiten que, a la vez que se genera la mutación, aparezca o desaparezca una diana de restricción, lo que facilita el posterior análisis (FigM3).

Las construcciones de p85α utilizadas contienen, en sus distintas versiones, la proteína de ratón. Para expresar la proteína completa se utiliza el vector pCG-p85HA, para expresar el fragmento C-terminal que contiene los dominios SH2 se usa la construcción pSG5-p50FLAG y el extremo N-terminal con la región SH3 está codificado en el vector pcDNA3-HA-SH3Bcr

Cultivo celular y transfección transiente. Las células Jurkat se cultivan y transfectan tal como se indica en la sección anterior.

Las células presentadoras de antígeno EBV-221 se mantienen en medio RPMI suplementado con 10% FCS, 4mM glutamina, 1mM piruvato sódico y 1x de aminoácidos no esenciales (Bio-whittaker). Para permitir su carga con el superantígeno (SEE de *Staphylococcus*), se incuban un máximo de $10x10^6$ células con 10µl de SEE (0,1mg/ml) en 1ml de medio si suero durante 2h a 37ºC. Pasado este tiempo se lavan 2 veces con medio y se mantienen a 37ºC en medio completo hasta su uso.

Las células Hek293 se crecen en DMEM suplementado con 10% FCS y 2mM glutamina. Para su transfección se utiliza el sistema de lipofectamina de Invitrogen tal como se indica en los protocolos de la casa comercial. Tras la transfección se mantienen un mínimo de 24h en cultivo antes de procesarlas.

Tinción de membranas internas. Se utiliza Bodipy-TR-Ceramida que se resuspende en cloroformo:etanol (19:1 v/v) generando un stock a 1mM que se conserva a -20ºC. Se retiran 50µl de este stock y se evapora el solvente en una atmósfera de N_2. El lípido resultante se resuspende en 200µl de etanol y se incorpora a 10ml de HBSS obteniendo una solución 5µM que se conserva a -20ºC en alícuotas. Para llevar a cabo la tinción se recogen las células necesarias y tras lavarlas con HBSS se resuspenden en la solución de Bodipy-TR-Ceramida 5µM (un máximo de $4x10^6$ células por cada 100µl). Se incuban a 4ºC durante 30min y tras 4 lavados con medio frío se cultivan un mínimo de 30 min a 37ºC para facilitar la incorporación del reactivo.

Microcopía confocal con células intactas. Las células Jurkat tras 24h desde la transfección con pEGFPRasGRP1, pEGFPRasGRP1F544G, pEGFPRasGRP1P442A, pEGFPRasGRP1P445A o pEGFPRasGRP1P442_5A se centrifugan y tratan, cuando se indica, para teñir su aparato de Golgi como se explica en el apartado anterior. Se resuspenden en HBSS y se recogen y transfieren a cámaras recubiertas con poli-D,L-lisina y tras permitir que se adhieran se mantienen a 37ºC para llevar a cabo la captura de imágenes. En los casos indicados el agente estimulante, PMA o PDBu (200 nM) se añade a la solución de HBSS tras capturar la primera imagen y se continua la captura a intervalos de 11s. Todas las imágenes se toman en un microcopio confocal y se analizan con el programa ImageJ.

Estimulación con microesferas recubiertas de anticuerpos. Las microesferas se preparan tal como se indica en la sección anterior, usando, en los casos indicados, sólo αCD3. Para la estimulación las células se recogen en HBSS y se tratan o no con U73122 (1µM, 20min); se mezclan con microesferas recubiertas de anticuerpos en una proporción 1:1 (células:microesfera) manteniendo, en los casos necesarios, el inhibidor a la concentración requerida. La mezcla se deposita sobre las cámaras recubiertas de poli-D,L-lisina y se capturan las imágenes con un microscopio confocal y se analizan con el programa ImageJ.

Detección de Ras-GTP y Ral-GTP. Las células transfectadas con pEGFP o pEGFPRasGRP1 se estimulan con anticuerpos solubles αCD3+αCD28 y en presencia o no de U73122 1µM y posteriormente se procesan tal como se indica en la sección anterior.

RasGRP1 P442A:

5´ CCA AGG AAC CAC AGA GCC CCG GCA CTG ACA CCT TCG AAG
Arg Ala

ApaI
AGG GCC CCG CCA
Arg Pro

RasGRP1 P445A:

5´ CCA AGG AAC CAC AGA GCC CCG CCA CTG ACA GCT TCG AAG CCA CCA GTT
Arg Ala

ApaI
AGG GCC CCG CCA CTG ACA CCT
Arg Pro

RasGRP1 P442_5A:

5´ CCA AGG AAC CAC AGA GCC CCG GCA CTG ACA GCT TCG AAG CCA CCA GTT
Arg Ala Ala

ApaI
AGG GCC CCG CCA CTG ACA CCT
Arg Pro Pro

RasGRP1 E494A

HindIII
5´ GGA TAT ATC TCT CAG GAA GCT TTT GAA AAG ATT GCT
Glu Ala

GAG GAG
Glu Glu

RasGRP1 E521A

HgaI
5´ CTC ATC AGC AGA GAC GCG ATC ACA GCC TAC TTC
Ala

GAG
Glu

RasGRP1 R271E

XhoI
5´ CCC ACC CCA CAG CTC GAG GCA GAG GTC TTC ATC
Glu

CGG
Arg

Figura M3 – Oligonucleótidos utilizados para la generación de mutantes en pEGFP-RasGRP1.
Se muestran los oligonucleótidos diseñados para generar las mutaciones puntuales indicadas, en la proteína RasGRP1. Se indica en cada caso (iniciando la secuencia con 5´), uno de los dos oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis y debajo la secuencia original que se muta. Con una línea azul se indican los codones que se mutan en cada caso y los aminoácidos por lo que codifican. En rojo las dianas de restricción que desaparecen cuando se produce la mutación y en verde las que aparecen.

Estimulación con células presentadoras de antígeno (APC). Las células presentadoras, cargadas o no con el superantígeno, se incuban con las células Jurkat, tratadas y/o transfectadas tal como se indique, en una proporción 1:1 durante 15min a 37ºC en HBSS. Posteriormente la mezcla se deposita sobre cámaras de microscopía recubiertas con poli-D,L-lisina para realizar vídeo-microscopía. En el caso de la detección de pERK por inmunofluorescencia las células se preparan sobre cubreobjetos y se procesan tal como se indica en la sección anterior en el apartado "inmunofluorescencia". En este caso el anticuerpo primario reconoce αpThr202/αpTyr204ERK y se incuba durante 12h a 4ºC y el anticuerpo secundario está conjugado con Cy2.

Estimulación con αCD3+αCD28 sobre placa. Las superficie a tratar se incuba a temperatura ambiente 1h o a 4ºC 12h con una mezcla de los anticuerpos αCD3+αCD28 (5µg/ml cada uno) en 150mM Tris-HCl pH 8. En el momento de la estimulación las células Jurkat, previamente transfectadas con las construcciones indicadas y tratadas con Bodipy-TR-Ceramida, se resupenden en HBSS y se depositan sobre las cámaras de microscopía para la observación de células intactas o sobre cristales para poder fijarlas. Se mantiene la temperatura a 37ºC durante todo el proceso y las células se observan o fijan, con 2% PFA, a los tiempos indicados, estableciendo t=0 como el momento en que la suspensión celular se incorpora.

Para la estimulación de timocitos con anticuerpos sobre placa para procesar posteriormente las muestras en ensayos bioquímicos se sigue el siguiente protocolo. Se sacrifican varios ratones de 10 semanas y se extraen los timos. Estos órganos se disgregan hasta obtener una suspensión celular en 1% FCS en PBS. Los timocitos obtenidos se cuentan y se mantienen en condiciones de privación de suero durante 90min y pasado este tiempo se depositan sobre placas de 35mm tratadas con αCD3+αCD28 y con un máximo de $20x10^6$ células por pocillo. Se centrifuga 1 min a baja velocidad para permitir que las células se depositen y entren en contacto con el anticuerpo y se incuban a 37ºC los tiempos indicados. Transcurrido el tiempo las placas se depositan sobre nieve carbónica y las células se recogen en PBS frío para parar la señalización.

Inmunoprecipitación. Las células (Jurkat, timocitos o Hek293) estimuladas o no como hemos descrito anteriormente, se resuspenden en tampón de lisis (50mM Tris-HCl pH 7,4, 1% NP40, 150mM NaCl, 10mM NaF, 10mM $Na_4P_2O_7$, 1mM Na_3VO_4, 1mM PMSF y 10µg/ml de aprotinina y leupeptina) y se incuban 15min a 4ºC. Tras la centrifugación (15000*x*g, 15 min, 4ºC), los sobrenadantes se analizan para establecer la concentración de proteína ("*DC protein assay*", BioRad) y separar una cantidad equivalente de cada muestra para realizar los controles necesarios y para la inmunoprecipitación con los anticuerpos específicos contra GFP, p85, FLAG, HA o RasGRP1 según corresponda. Antes de esta incubación los lisados se tratan durante 1h a 4ºC con γ-sefarosa, se centrifugan y se recogen los sobrenadantes que ya se incuban durante 8-12h a 4ºC en la noria con los anticuerpos. Pasado este tiempo se añade γ-sefarosa, previamente bloqueada con 3%BSA, y se incuba 1h a 4ºC en la noria. Los inmunoprecipitados se lavan dos veces con tampón de lisis, 1 vez con 0,5M LiCl en 10mM Tris-HCl pH 7,4 y 3 con 10mM Tris-HCl pH 7,4. Todos las muestras obtenidas se analizan por SDS-PAGE en condiciones reductoras y se transfieren a membranas de nitrocelulosa para posterior inmunodetección con los anticuerpo indicados.

Ensayo de Doble Híbrido con RasGRP1

Generación de las construcciones necesarias y de la librería. Se subclona RasGRP1, a partir del vector que codifica la proteína de rata cedido por J.C. Stone (Dept. Biochemistry, Univ. Alberta, Canada) en pGBKT7m, variante de pGBKT7 que cambia su pauta de lectura. El dominio SH3 de p85α se obtuvo por PCR usando como molde pCG-p85HA y unos oligonucleótidos que amplifican la región que codifica por los aminoácidos 1 a 83 e incluyen dos dianas de restricción para facilitar el clonaje en pGADT7: 5´ GAA TTC ATG AGT GCA GAG GGC TAC CAC y 3´ GGA TCC GTG AAA TTC TTT TCC TTC CAA TGT ATT C.

La librería se generó a partir de células obtenidas de ganglios, bazos y timos de ratonas de tres meses de la cepa BALB/C, tras retirar, en el caso del bazo, los eritrocitos y todas aquellas células de la línea mieloide que se adhieren al plástico. Una vez obtenidas las células se siguió el protocolo establecido por Clontech ("*BD Matchmaker™ library construction*"). Brevemente, se extrajo y purificó el ARNm de las células usando el sistema "*QuickPrep mRNA purification kit*" de Amersham y posteriormente se analizó su pureza y estado. Se usó 1µg para llevar a cabo la síntesis del ADNc con los oligonucleótidos al azar del sistema y éste se amplificó por PCR con unos oligonucleótidos que generan en cada extremo las regiones necesarias para la recombinación. Se purifica con las columnas "*BD-Chroma Spin™ TE-400*" y se precipita y resuspende en 20µl para la posterior transformación.

Se transforman levaduras de la cepa AH109 con el vector pGADT7-Rec y el ADNc siguiendo estrictamente los protocolos de la casa comercial. Como resultado de la

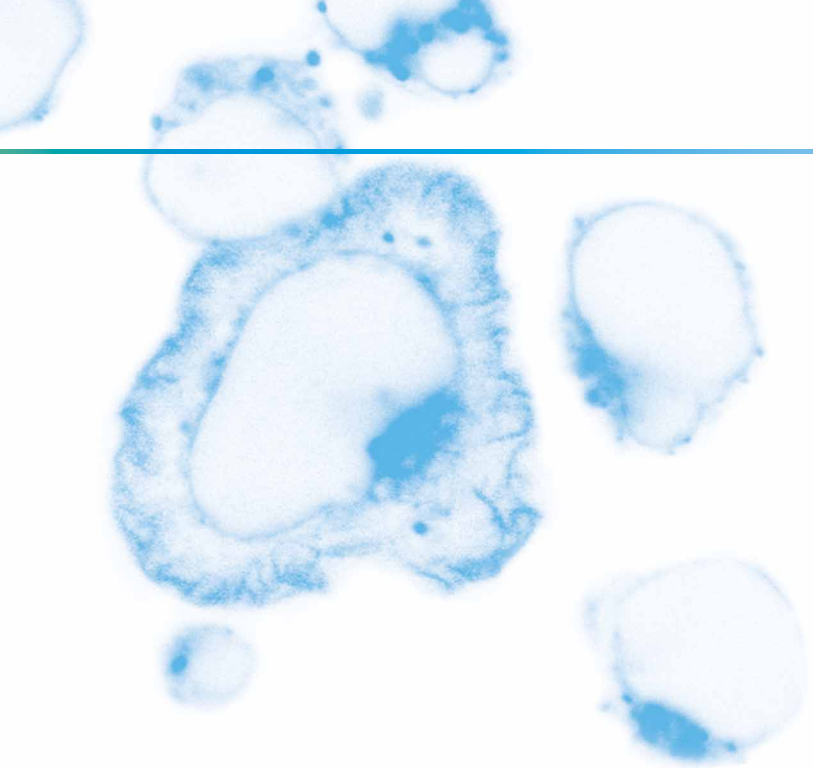
transformación se obtienen 200 placas de SD-Leu de 150mm de diámetro donde sólo crecen aquellas levaduras que, por recombinación, hayan generado al menos un vector completo que contenga un fragmento de ADNc. Se comprueba la eficiencia de transformación y se recogen 100 colonias individuales al azar para analizar por PCR con oligonucleótidos específicos el porcentaje de levaduras que contienen más de un vector de la librería y el tamaño medio de los fragmentos de ADNc. Para obtener los moldes utilizados para la PCR, con ayuda de un palillo se recoge una pequeña fracción de la colonia en estudio y éste se introduce en 10µl de la solución de extracción del sistema "*MasterAmp™ Bucal Swab DNA extraction kit*" (Epicentre). Se incuba a 60ºC 10min y a 98ºC 8min se mezcla con el vortex durante 15s y tras 5 min a 98ºC se retira un 1µl para la PCR. Los oligonucleótidos utilizados son: 5´ TAC CAC TAC AAT GGA TGA TG y 3´ GGT GCA CGA TGC ACA GT.

Cuando se observa un crecimiento uniforme de las colonias se recogen todas ellas en YPD con 25% glicerol y se congelan a –80ºC en alícuotas de 1ml con una concentración superior a $2x10^7$ levaduras/ml. Se hacen diluciones seriadas para contar el número de colonias y establecer el título de la librería: $2,4x10^8$cfu/ml.

Transformación de las cepas AH109 y Y187 con pGBKT7mRasGRP1 y pGADT7SH3 y posterior lisis. Una vez verificado el fenotipo de cada cepa (no hay crecimiento en ausencia de Trp, Leu, His, Ade) se transforman con cada una de las construcciones y los correspondientes vectores vacíos, tal como se indica en el apartado del mismo título de la primera sección y se crecen en ausencia de Leu en el caso de pGBKT7m y en ausencia de Trp para las transformaciones con pGADT7 y derivados.

Para analizar la expresión de las construcciones se selecciona un clon de cada tranformación y se crece en medio líquido SD-Trp o SD-Leu a 30ºC con agitación durante 12-18h. La velocidad de crecimiento de los clones que expresan los cebos en comparación con los que sólo portan el vector vacío es indicativa de la toxicidad o no del cebo en estudio. Transcurrido el tiempo de cultivo se mide la $DO_{\lambda=600}$ y este valor dividido por 7,5 es el volumen necesario en ml de tampón de lisis (8M urea, 5% SDS, 40mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1mM EDTA, 0,4mg/ml azul de bromofenol, 10mM NaF, 10mM $Na_4P_2O_7$, 1mM Na_3VO_4, 5mM PMSF y 10µg/ml de aprotinina y leupeptina) al que se incorporan por cada 1ml 10µl de βmercaptoetanol. Las levaduras se centrifugan y congelan en nieve carbónica para resuspenderlas en el volumen necesario de tampón de lisis, previamente calentado a 60ºC. Se incuba a 70ºC 10min y se añaden esferas de vidrio para con ayuda del vortex durante 1min romper las células. Se centrifuga a máxima velocidad y el sobrenadante resultante se calienta 5min a 98ºC para proceder a su análisis por electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras y posterior WB e inmunodetección con anticuerpos específicos contra HA, epítopo del vector pGADT7 o Myc, en pGBKT7m.

Transformación de las cepas AH109 y Y187 estables para pGBKT7mRasGRP1 y pGADT7SH3. El clon seleccionado tanto de AH109 como de Y187 que expresa pGBKT7mRasGRP1 se crece en placas de SD-Trp/-His con distintas concentraciones de 3AT para comprobar si RasGRP1 tiene capacidad transactivadora y las levaduras que la expresan pueden crecer en ausencia de His. Al cabo de 10 días no se observa ningún crecimiento por lo que el análisis de interacción con el dominio SH3 se realiza en ausencia del inhibidor. Se transforman los clones de levaduras (AH109 y Y187) que expresan RasGRP1 o SH3 con los vectores pGADT7/pGADT7SH3 y pGBKT7m/pGBKT7mRasGRP1 respectivamente. Se sigue el protocolo explicado en el apartado correspondiente de la primera sección. Las levaduras transformadas se crecen en placas SD-Leu/-Trp para comprobar la eficiencia de transformación y en placas SD-Leu/-Trp/-His o SD-Leu/-Trp/-His/-Ade+XαGal para observar a lo largo de 10-15 días si se produce la interacción entre las dos proteínas y como consecuencia las levaduras crecen en condiciones restrictivas y son capaces de transformar el sustrato XαGal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido en dimetilformamida) y dar lugar a colonias azules.



RESULTADOS

ANÁLISIS DE LOS EFECTOS PROVOCADOS POR LA ALTERACIÓN DE LA ACTIVIDAD DGK EN DISTINTOS CONTEXTOS CELULARES

Aunque se conocen numerosos efectores de DAG y PA en las células (revisado en 52, 183, 542), todavía no se ha podido establecer con exactitud si alguno de ellos u otros desconocidos están regulados por la actividad DGK en cualquiera de las 10 isoformas, que se expresan en mamíferos (Tabla I1).

Los efectores de DAG son capaces de reconocer este lípido a través de su dominio C1 (revisado en 51, 52, 168, 243, 244, 245, 450, 542). En el caso del PA, todavía se desconoce cómo tiene lugar el reconocimiento y la unión a los efectores. No se sabe si existe algún dominio específico para la unión o si simplemente se trata de una secuencia aminoacídica con algunos residuos cargados positivamente en posiciones conservadas. Los datos obtenidos recientemente parecen apostar por esta segunda posibilidad[230,292].

En el laboratorio hemos trabajado fundamentalmente en la caracterización de dos de las isoformas de DGK, DGKα[80,137,138,229,362,416,417] y DGKζ[25,418]. A lo largo del tiempo este estudio ha permitido generar numerosas herramientas que decidimos usar para estudiar los efectos que provocaba la alteración de la actividad DGK en distintos contextos celulares. Entre estas herramientas se encuentran dos construcciones que permiten expresar en la célula proteínas con actividad DGKα constitutiva: Myr-GFPDGKα o GFPΔ196DGKα. La primera de ellas controla la expresión de la proteína silvestre fusionada a una señal de miristoilación que permite el anclaje de la proteína a la membrana plasmática donde la enzima encuentra su sustrato y así lo transforma sin necesidad de una estimulación previa. La construcción de GFPΔ196DGKα, dirige la expresión de un mutante sin los 196 residuos N-terminal de la proteína, que se expresa de forma constitutiva en membrana plasmática[416]. Este mutante, por lo tanto, tiene acceso al sustrato en ausencia de estímulo aumentando de forma constitutiva la actividad DGK de las células que lo expresan.

Para intentar caracterizar cuál es el mecanismo que mantiene a la construcción GFPΔ196DGKα asociada con la membrana plasmática y si esta interacción es dependiente de la asociación con otras proteínas, llevamos a cabo un ensayo de doble híbrido. Este análisis también nos podía ayudar a encontrar otros elementos necesarios para la translocación de la proteína silvestre a la membrana plasmática, además de los ya descritos[416], o nuevos efectores que interaccionasen con la proteína.

1 ANÁLISIS DE DOBLE HÍBRIDO USANDO COMO CEBO Δ196DGKα

Generamos una proteína de fusión de Δ196DGKα con el dominio de unión a ADN del factor de transcripción GAL4. Esta construcción se expresaba correctamente en levaduras de la cepa HF7c (FigR1A) que se usaron para llevar a cabo el análisis de doble híbrido. Las levaduras que expresan la construcción cebo se crecen en ausencia de Trp y se transformaron en un primer análisis con una librería de leucocitos (Clontech, #HL4021AB) (FigR1B). La transformación se creció en medio restrictivo -W/-L/-H con 15mM de 3AT para evitar el crecimiento de falsos positivos. De los 600 clones aislados originalmente sólo 126 continuaron creciendo en el medio restrictivo aunque ninguno de ellos

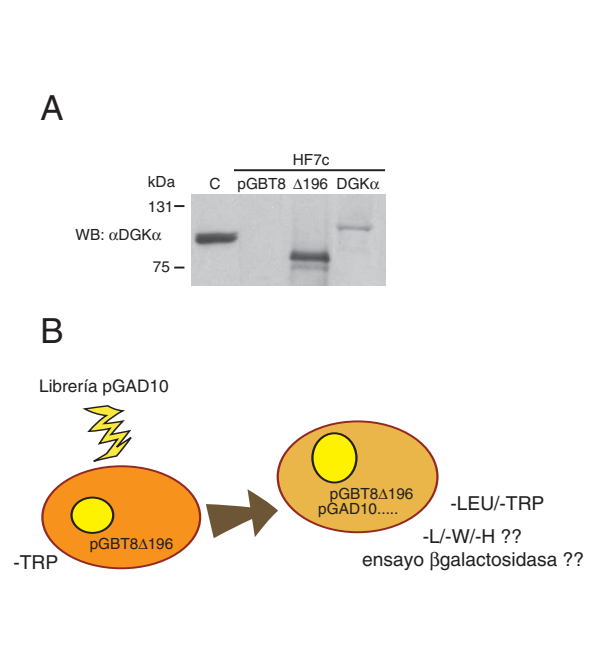


Figura R1 – Expresión de GAL4BD-Δ196DGKα y GAL4BD-DGKα en levaduras. Esquema del análisis de doble híbrido. Se transformaron levaduras HF7c con pGBT8, pGBT8-Δ196DGKα o pGBT8-DGKα y se mantuvieron en ausencia de Trp.

A – Se lisaron las levaduras y los extractos obtenidos se resolvieron por electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras. Las proteínas de fusión con el dominio de unión a ADN del factor GAL4 se detectaron con un anticuerpo específico contra DGKα. Se usó como control (C) un lisado de células Jurkat transfectadas con GFPDGKα.

B – Las levaduras que expresan pGBT8-Δ196DGKα se transformaron con la librería de doble híbrido correspondiente generando levaduras capaces de crecer en ausencia de Trp y Leu. Estas levaduras se crecieron en un medio restrictivo –Leu/-Trp/-His con distintas concentraciones de 3AT. Para analizar la interacción entre Δ196DGKα y cualquier proteína codificada en la librería se tuvieron en cuenta tanto el crecimiento en el medio restrictivo como la actividad βgalactosidasa de los clones seleccionados.

fue positivo en un análisis de actividad βgalactosidasa. Secuenciamos cada uno de los clones tras extraer el plásmido de las levaduras y recuperarlo con un paso previo por bacterias (ver materiales y métodos). De los 126 clones, 32 no pudieron ser secuenciados, 37 contenían secuencias codificadas al revés, 18 correspondían con regiones cromosómicas no codificantes y 39 eran fragmentos de mensajeros de proteínas ya descritas o partes de mensajeros que codifican para proteínas desconocidas.

Dado que la única proteína que se repitió entre los 126 clones fue la actina y que también detectamos otros componentes del citoesqueleto que suelen estar próximos a membrana y asociados también con actina decidimos cotransformar las levaduras con nuestra proteína cebo y los plásmidos codificantes para estos clones (Tabla R1). En ninguno de los casos pudimos detectar crecimiento en condiciones restrictivas.

Se repitió el ensayo de doble híbrido en dos ocasiones más con una nueva librería de células Jurkat (Clontech, #HL4015AB) que amplificamos en el laboratorio (ver materiales y métodos). Aumentamos la concentración de 3AT para realizar el análisis en condiciones más restrictivas pero la mayor parte de los clones que analizamos no contenían plásmido. En la tabla R1 se muestra un resumen de los tres ensayos realizados.

2 MODULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE AKT POR DGK

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado tanto la importancia de la vía de PI3K como de la de DGK en la proliferación inducida por IL2 en linfocitos[78,79,137,138,329,331]. El receptor de IL2 está constituido por tres cadenas α (p55), β (p70) y γ (p64). β y γ, que se expresan constitutivamente, son las responsables de los fenómenos de transducción de la señal hasta el núcleo mientras que la función de α es la formación del receptor de alta afinidad, induciéndose su expresión tras la activación de los linfocitos[341]. La estimulación de las células con IL2 no produce los incrementos en DAG descritos para otros receptores ya que no hay una actividad PLC asociada con la señalización a partir del receptor de IL2. En nuestro laboratorio, sin embargo, sí se ha descrito una actividad DGK que provoca aumentos en los niveles de PA en respuesta a la estimulación[137,138] lo que nos permite usar el modelo de activación por IL2 y nuestras herramientas de DGK para estudiar fundamentalmente, efectores de los cambios de PA y no de la modulación del DAG.

Aunque en nuestro laboratorio se ha demostrado que la actividad DGK es necesaria de forma independiente a la de PI3K para permitir la proliferación de los linfocitos[138], nos planteamos estudiar si existía alguna conexión entre las dos vías que favoreciese aún más sus respectivas actividades. En este sentido hemos descrito en nuestro laboratorio la capacidad de los productos generados por la PI3K de activar a DGKα induciendo su translocación a membrana y aumentando su capacidad catalítica[80].

Para estudiar una posible conexión a la inversa, actividad DGK sobre PI3K, decidimos usar las células Bafβwt, células proB dependientes de IL-3 que expresan constitutivamente la cadena α y γ del receptor de IL-2[330] y que hemos transfectado de forma estable con la cadena β de dicho receptor. Estas células se transfectaron con AKT y p110-CAAX, la subunidad catalítica de PI3K modificada

N° de análisis	Librería utilizada	N° de clones aislados	N° de clones creciendo en –W/-L/-H	N° de clones +βgalactosidasa	Clones aislados para confirmar
1	Leucocitos estimulados con PHA de 4 individuos caucasianos HL4021AB	600	126 (15mM 3AT)	0	#22 Actina #26 Cofilina #40 Arp2/3 #126 LSP1
2	Células Jurkat HL4015AB	732	0 (20mM 3AT)	-	-
3	Células Jurkat HL4015AB	2534	105 (20mM 3AT)	0	-

Tabla R1 – Resultados de los análisis de doble híbrido
Se muestran los resultados de las tres transformaciones llevadas a cabo sobre levaduras que expresaban pGBT8-Δ196DGKα. Se indican las librerías utilizadas, todas ellas de Clontech, con su número de referencia. Las levaduras se crecieron en el medio restrictivo –W/-L//-H con la cantidad de 3AT indicada y se analizó su actividad βgalactosidasa (ver materiales y métodos). Se indican, cuando corresponde, los números de los clones seleccionados y la proteína que codifican para proceder a su confirmación por cotransformación. LSP1: proteína específica de linfocito 1.

para estar asociada constitutivamente a membrana y por lo tanto activa. La simple expresión de p110-CAAX aumenta la actividad de la proteína AKT transfectada, medida en un ensayo in vitro usando como sustrato histona 2b (H2b). Este incremento en actividad correlaciona con la fosforilación del residuo Ser473 que es necesaria para que la proteína sea activa[9] (FigR2A). Si en estas condiciones transfectábamos además DGKα se duplicaba la actividad de la proteína AKT y su fosforilación, sólo en el caso de una previa activación de la vía inducida por la expresión de p110-CAAX (FigR2A). Para comprobar si este efecto era reproducible en unas condiciones de estimulación fisiológica de la vía de PI3K, se estimularon las células Bafβwt con IL2 en presencia o no de la forma constitutivamente activa de DGKα, Myr-GFPDGKα. El incremento de la actividad de AKT en respuesta a IL2 y en presencia de Myr-GFPDGKα es menor que el descrito en el caso de la activación por la expresión de p110-CAAX (FigR2B).

Este efecto menor puede ser debido a que la expresión de esta forma de DGKα provoca aumentos de actividad DGK en localizaciones donde no puede colaborar de forma apropiada con elementos de la vía de fosforilación y activación de AKT como PDK1 que interacciona con fosfatidilinositoles fosforilados en la posición 3 en localizaciones definidas de la membrana[234].

Sin embargo, si tratábamos las células Bafβwt, antes de la estimulación con IL2, con un inhibidor de DGKs de tipo I, R59949, se producía una bajada en los niveles de fosforilación de AKT. Estos datos parecen indicar que en las células Bafβwt no existe la independencia descrita entre las vías de PI3K y DGK en las células CTLL-2[138]. Para inhibir la actividad DGK en las células Bafβwt necesitamos usar 10 veces más inhibidor que en las células CTLL-2 lo que podría indicar la presencia de otra actividad DGK tipo I que estuviese colaborando con la vía de PI3K en estas células, distinta a la descrita en células CTLL-2.

La actividad DGK colabora en la activación de la vía de PI3K, medida como activación de AKT, en células Bafβwt.

3 EFECTO DEL INCREMENTO DE ACTIVIDAD DGK EN LA MORFOLOGÍA CELULAR

Como se resume en la tabla I1, se ha descrito en al menos cuatro casos una posible relación entre la actividad DGK y el citoesqueleto. DGKγ, por fraccionamiento subcelular se asocia con la fracción de citoesqueleto[159] y además su actividad disminuye la cantidad de Rac-GTP en respuesta a PDGF[489]. DGKθ, se asocia con RhoA-GTP[190,296]. DGKα participa en la migración de células PAE en respuesta a HGF[94] y VEGF-A[28] y se ha relacionado una actividad DGK[480], probablemente DGKζ[303], con la activación de la

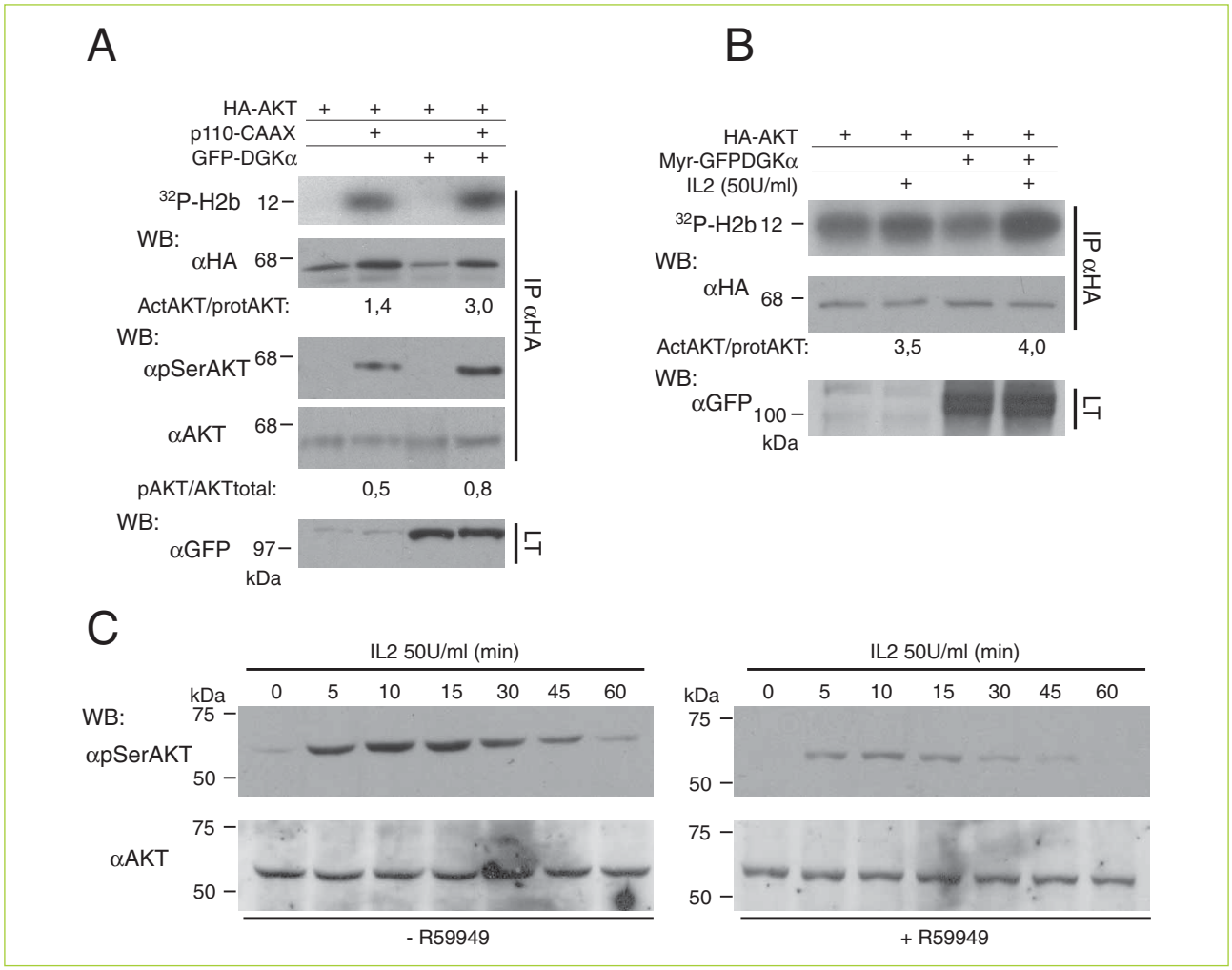


Figura R2 – Efecto de la sobre-expresión de DGKα o de su inhibición farmacológica sobre la actividad AKT

A – Se transfectaron células Bafβwt con HA-AKT y p110-CAAX o GFPDGKα según se indica. Transcurridas 24 horas de cultivo se retiró el suero del medio y las células se mantuvieron en estas condiciones durante 4 h, se recogieron y se lisaron. Los extractos celulares se cuantificaron para separar alícuotas para los controles de expresión (LT) o para la inmunoprecipitación con un anticuerpo contra HA (IPαHA) (ver materiales y métodos). Estos inmunoprecipitados se separaron en dos para analizar por un lado, la actividad de la proteína en un ensayo de fosforilación con [γ-^{32}P]ATP usando como sustrato histona 2B (H2b) (ver materiales y métodos) y por otro, su fosforilación por WB con anticuerpos específicos contra la Ser en posición 473 (αpSerAKT). Las autoradiografías obtenidas se utilizaron para realizar un análisis densitométrico de las bandas de interés y calcular la actividad AKT o su fosforilación con respecto a la cantidad de proteína AKT que hay en los inmunoprecipitados: ActAKT/protAKT o pAKT/AKTtotal, respectivamente (en unidades arbitrarias).

B – Se transfectaron células Bafβwt con HA-AKT y en los casos indicados con Myr-GFPDGKα. Tras 24 h en cultivo se retiró el suero del medio y las células se mantuvieron en estas condiciones 4 h para entonces estimular con IL2 recombinante (50U/ml) durante 10 min. Se recogieron las células y se lisaron para obtener los extractos celulares que se cuantificaron y se separaron en alícuotas para los controles de expresión (LT) o para inmunoprecipitar con un anticuerpo contra HA (IPαHA). Estos inmunoprecipados se utilizaron para analizar la actividad AKT como se indica en el apartado A. Las autoradiografías obtenidas se analizaron como en el apartado anterior para expresar la actividad AKT en relación a la cantidad de proteína AKT que hay en el inmunoprecipitado: ActAKT/protAKT (unidades arbitrarias).

C – Se recogieron células Bafβwt y se mantuvieron en ausencia de suero 4 h añadiendo R59949 (10μM) las 2 últimas horas en los casos indicados (-/+R59949). Pasado este tiempo las células se estimularon con IL2 (50U/ml) y se recogieron y congelaron a los tiempos indicados. Se lisaron y los extractos obtenidos se cuantificaron, para una vez ajustada la cantidad de proteína, resolverlos por electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se detectó la fosforilación de AKT por WB usando un anticuerpo específico contra la Ser en posición 473. La misma membrana se utilizó posteriormente para realizar el control de carga con un anticuerpo que reconoce la proteína AKT total. Para comprobar el efecto del inhibidor farmacológico se marcaron las células con ioduro de propidio y se compararon los perfiles de ciclo celular de las dos poblaciones, tratada o no con R59949. La adición del inhibidor disminuye el porcentaje de células en fase S y aumenta ligeramente la apoptosis.

enzima PI4P5K cuyo producto, PI4,5P_2, entre otros efectos, controla el desensamblaje de los filamentos de actina[481].

Para intentar conocer con más precisión el papel de las DGKs y sus posibles efectores en la reorganización del citoesqueleto y la migración celular, decidimos, como primera aproximación, estudiar qué le ocurría a la célula a nivel microscópico si tenía una actividad DGK constantemente asociada a la membrana plasmática y activa.

Usamos como modelo las células PAE, una línea establecida a partir de endotelio de aorta de cerdo, que expresa de forma estable el receptor β para PDGF que es estimulado sólo por PDGF BB[523]. Tras la estimulación, este receptor es capaz de iniciar una cascada de fosforilaciones que finaliza en la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de lamelipodios[121,177]. La ventaja de este sistema celular es la fácil detección de cambios en el citoesqueleto ya que son células grandes y que responden con facilidad a PDGF y a otros estímulos como LPA, que genera fibras de estrés[92], FGF o EGF. Cada uno de estos agonistas da lugar a estructuras muy definidas en la célula por lo que la posible alteración de éstas por la expresión de una DGK activa nos permitiría ir acotando cuáles son las vías en las que puede actuar la actividad DGK, es decir, el aumento de PA y la bajada de DAG.

A) Expresión de DGKα y sus formas constitutivamente activas en células PAE

Transfectamos células PAE con la forma silvestre de DGKα o las dos formas asociadas constitutivamente a membrana, Δ196DGKα y MyrGFPDGKα. La expresión de cualquiera de estas construcciones provoca un aumento de actividad DGK en la célula, cuando medimos la incorporación de ^{32}P al C8-DAG añadido como sustrato exógeno (FigR3B). Este incremento es mayor en el caso de las dos formas constitutivamente activas y correlaciona con una alteración más pronunciada de la morfología celular: el contorno celular se altera y las células muestran extensiones más irregulares que las células control (FigR3A). Cuando se realizó la tinción para actina con faloidina-RD no se detectaron diferencias ni en el número ni en el grosor de las fibras. (FigR3A).

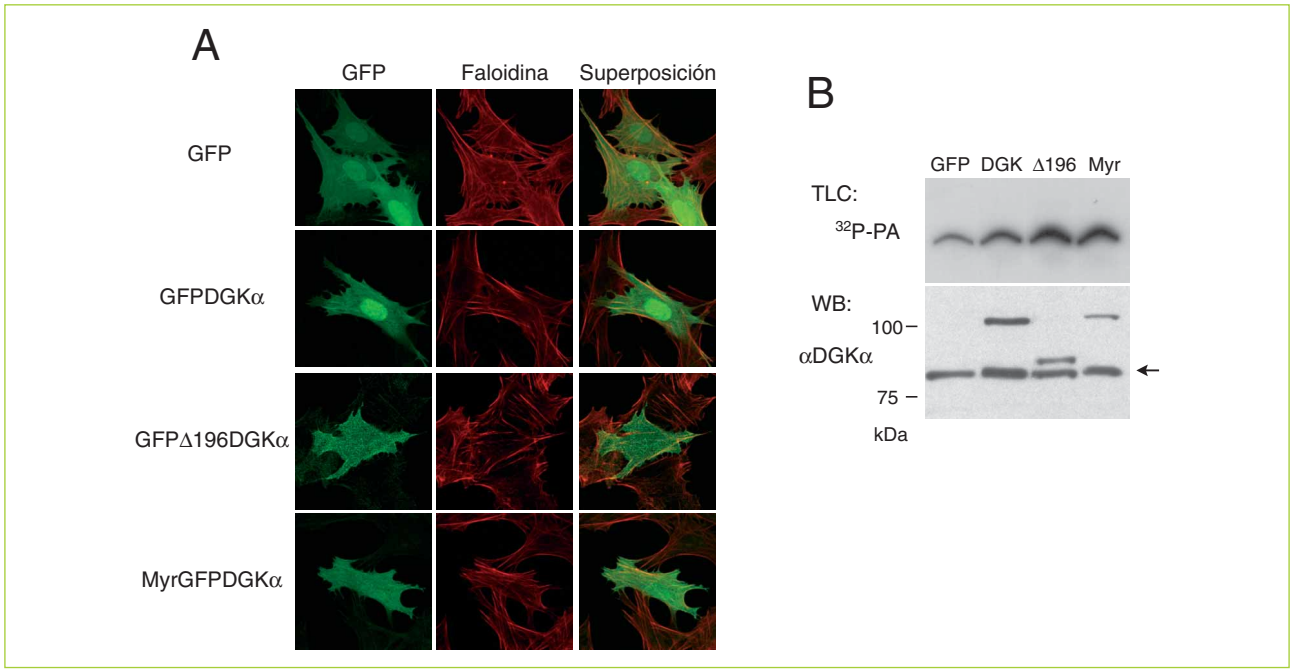


Figura R3 – Efecto de la expresión de DGKα o de sus formas constitutivamente activas: Δ196DGKα y MyrDGKα en la morfología de las células PAE.
Se transfectaron células PAE con las construcciones indicadas, pEFEGFP, pEFEGFP-DGKα, pEFEGFP-Δ196DGKα o pEF4-MyrGFPDGKα y pasadas 24 h se procesaron.

A – Las células se crecieron sobre cubreobjetos para posteriormente fijarlas con PFA4% y marcar el citoesqueleto de actina con faloidina-RD. En verde se muestra la localización de las distintas construcciones, en rojo la tinción con faloidina y en los paneles de la derecha la superposición de los dos colores. Las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada caso.

B – Las células se recogieron y lisaron en ausencia de detergente para poder analizar la actividad DGK de los extractos celulares usando un sustrato exógeno, C8-DAG y [γ-^{32}P]ATP (ver materiales y métodos). Estos mismos extractos se utilizaron para analizar la expresión de las construcciones por WB con un anticuerpo específico contra DGKα. Se indica con una flecha la posición de la proteína DGKα endógena.

El incremento de actividad DGKα en las células PAE provoca alteraciones en la morfología celular, pero no cambios evidentes en la disposición ni en la cantidad de fibras de actina.

B) Actividad DGK en respuesta a la estimulación con PDGF

La estimulación con PDGF de las células PAE provoca la formación de grandes lamelipodios tras la activación de la vía de Rac[121,177]. Para comprobar si la actividad DGK podría estar implicada en esta vía estudiamos cómo respondía la proteína DGK endógena a la estimulación con PDGF. Medimos la incorporación de ^{32}P a C8DAG en un ensayo optimizado para las isoformas de DGK tipo I y pudimos comprobar que en respuesta a PDGF se produce una disminución de la actividad DGK (FigR4A). Si analizamos que ocurre al inmunoprecipitar la proteína DGKα transfectada, su comportamiento es el mismo (FigR4B). En estas mismas células sin embargo, se ha demostrado la activación de DGKα en respuesta a dos estímulos que también inducen migración, HGF[94] y VEGF-A[28], lo que indica una clara especialización en función de la vía activada para inducir la migración celular.

La actividad DGKα disminuye en células PAE estimuladas con PDGF.

Teniendo en cuenta los datos de actividad en respuesta a PDGF comprobamos si el aumento de actividad DGK podría dificultar el proceso de estimulación. De hecho, las células PAE transfectadas con DGKα silvestre y más aún en el caso de las dos formas constitutivamente activas muestran una clara dificultad para generar lamelas en respuesta a la estimulación con PDGF (FigR5A). Al analizar el efecto de la expresión de MyrGFPDGKα en células vivas, la incapacidad de generar una lamela completa era todavía más evidente (FigR5B,C); las células que expresan MyrGFPDGKα responden a PDGF generando pequeñas extensiones pero no pueden seguir avanzando hasta formar una lamela extensa y uniforme.

La expresión de las formas constitutivamente activas de DGKα en células PAE impide la formación de lamelipodios en respuesta a la estimulación con PDGF.

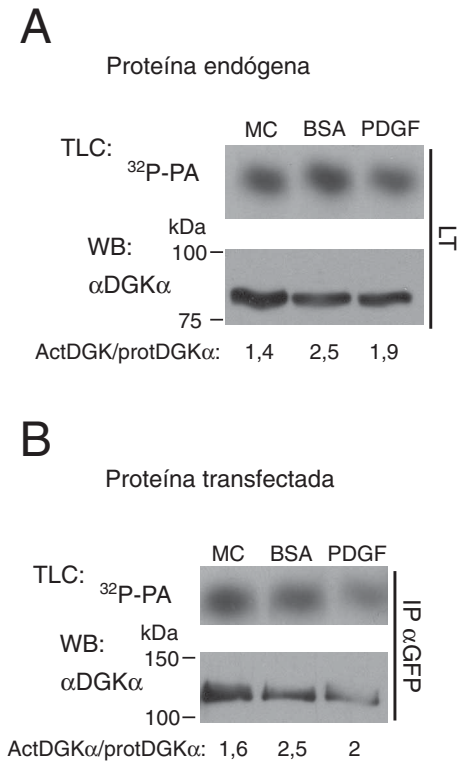


Figura R4 – Actividad DGK en respuesta a la estimulación con PDGF.

A – Se analizó la actividad DGK, tal como se indica en la figura R3B, en extractos de células PAE en condiciones de crecimiento exponencial en medio con suero (MC) o tras 19 horas sin suero y estimulación (PDGF) o no (BSA) con PDGF (50ng/ml) durante 12 minutos. Se analizó también la expresión de DGKα por WB usando un anticuerpo específico contra DGKα. Las autoradiografías obtenidas se utilizaron para realizar un análisis densitométrico de las bandas de interés y calcular la actividad DGK con respecto a la cantidad de proteína DGKα en los extractos totales (LT): ActDGK/protDGKα (unidades arbitrarias).

B – Se transfectaron células PAE con pEFEGFP-DGKα y tras mantenerlas en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior se lisaron para inmunoprecipitar la proteína transfectada con un anticuerpo contra GFP y analizar la actividad DGK en el inmunoprecipitado como se indica en la figura R3B y la cantidad de proteína por WB usando un anticuerpo específico contra DGKα. Las autoradiografías obtenidas se utilizaron para realizar un análisis densitométrico de las bandas de interés y calcular la actividad de DGKα en relación a la proteína DGKα inmunoprecipitada: ActDGKα/protDGKα (unidades arbitrarias).

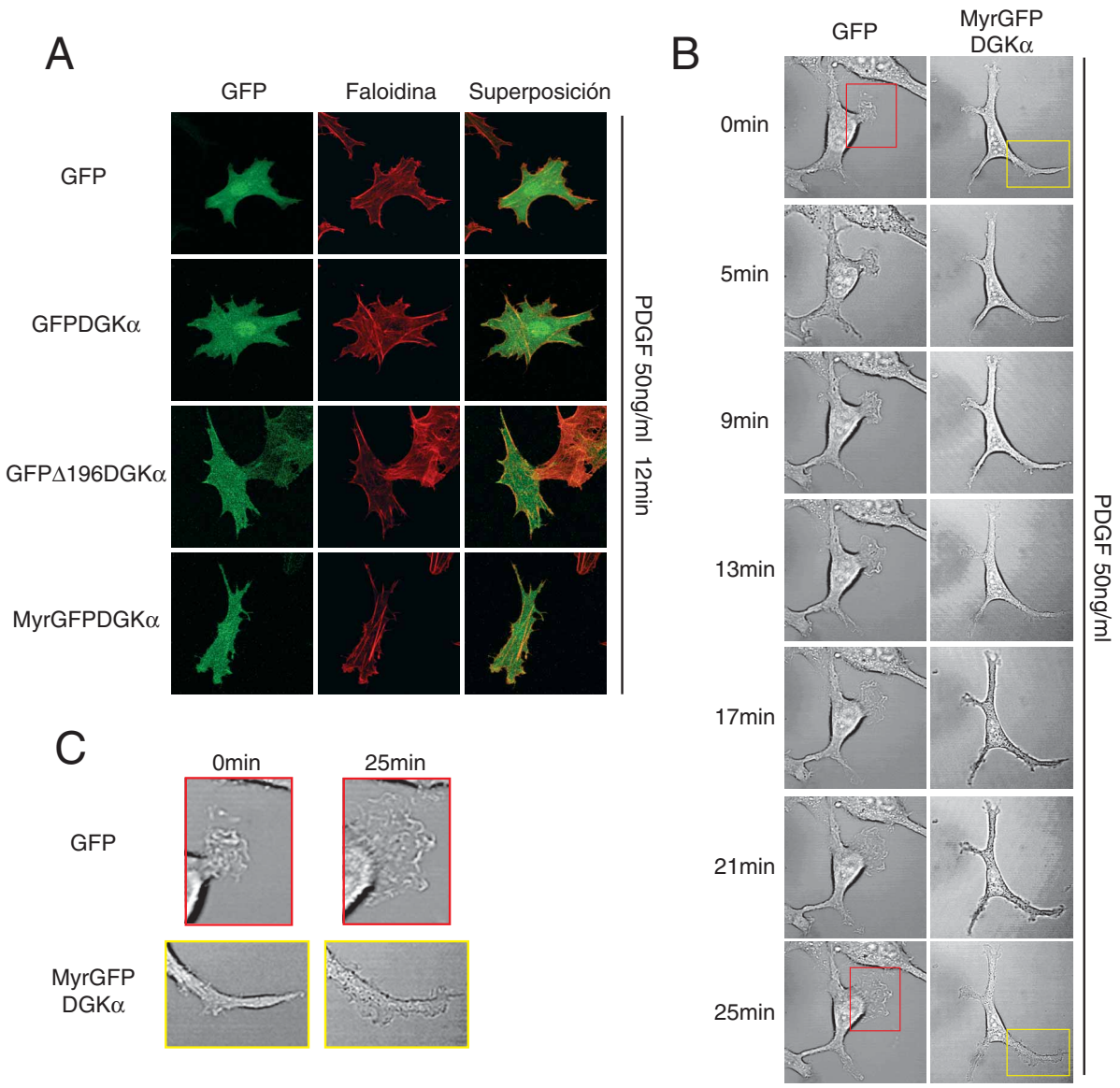


Figura R5 – Efecto de la expresión de DGKα o de sus formas constitutivamente activas: Δ196DGKα y MyrDGKα en la respuesta de las células PAE a PDGF.

A – Se transfectaron células PAE con las construcciones indicadas, pEFEGFP, pEFEGFP-DGKα, pEFEGFP-Δ196DGKα o pEF4-MyrGFPDGKα. Las células se crecieron sobre cubreobjetos durante 24 h y posteriormente se retiró el suero y las células se mantuvieron 20 h en BSA libre de ácidos grasos. Se añadió PDGF (50ng/ml) y pasados 12 minutos las células se fijaron en PFA4% y se procesaron para marcar el citoesqueleto de actina con faloidina-RD. En verde se muestra la localización de las distintas construcciones, en rojo la tinción con faloidina y en los paneles de la derecha la superposición de los dos colores. Las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada caso.

B – Se transfectaron células PAE con pEFGFP o pEF4-MyrGFPDGKα y se depositaron sobre cámaras de microscopía recubiertas con fibronectina. Tras 24 h de cultivo, se retiró el suero del medio y se sustituyó por BSA libre de ácidos grasos al 0,5%. Las células se mantuvieron así durante 10 h. Las cámaras se llevaron al microscopio confocal y se procedió a la captura de una primera imagen (t=0min) e inmediatamente después se añadió PDGF (50ng/ml) para continuar la captura cada 30s. Se han seleccionado las imágenes a los tiempos indicados para mostrar la respuesta de la célula a la adición de PDGF.

C – Se muestran las regiones marcadas en el apartado B a un mayor aumento.

C) Efecto de la expresión de MyrGFPDGKα en células con la vía de Rac constitutivamente activa.

Dado que pudimos observar un claro efecto debido a un aumento de la actividad DGK en la vía que va desde la estimulación con PDGF a la formación de los lamelipodios quisimos establecer en que punto podía interferir la actividad DGK. Como primera aproximación comprobamos si la expresión de una forma constitutivamente activa de Rac, V12Rac, era capaz de revertir el efecto de la expresión de MyrGFPDGKα. Las células que expresan V12Rac adquieren una morfología muy característica que se ha denominado de "huevo frito"[38] (FigR6) que no sufría ningún cambio en las condiciones en que había una mayor actividad DGK.

La expresión de V12Rac revierte el efecto provocado por el aumento de actividad DGK, indicando que los posibles efectores de DGK en este contexto atenúan la activación de Rac.

D) Efecto de la expresión de MyrGFPDGKα en la adhesión celular.

La activación de Rac se controla a través de sus GEFs, GAPs y GDIs[110,307] y en paralelo a esta vía, la célula activará y regulará espacialmente los mecanismos de contacto con el sustrato. Si la adhesión está alterada la célula es incapaz de establecer puntos de anclaje que permitan el avance y desarrollo del lamelipodio[447]. Para comprobar esta posibilidad en el caso de la expresión de MyrGFPDGKα, realizamos una tinción de los contactos focales usando un anticuerpo contra paxilina, uno de lo componentes de estos complejos de adhesión[164]. No pudimos detectar ninguna diferencia entre las células control que expresan GFP y las células que expresan MyrGFPDGKα (FigR7).

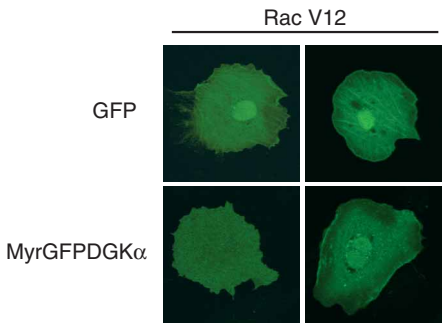


Figura R6 – Efecto de la sobre-expresión de RacV12 en células transfectadas con MyrGFPDGKα.
Se transfectaron células PAE con RacV12 y pEFEGFP o pEF4-MyrGFPDGKα según se indica. Se crecieron durante 24 h sobre cubreobjetos y se fijaron en PFA4% para su posterior observación en el microscopio confocal. Las imágenes seleccionadas son representativas de los campos analizados en cada caso.

La expresión de MyrGFPDGKα no altera ni el número ni el tamaño de los contactos focales analizados por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra paxilina.

Para intentar avanzar en el estudio de los mecanismos moleculares que provocaban estas alteraciones en la activación de la vía de Rac decidimos usar el modelo de *Dictyostelium discoideum*. Este microorganismo ha sido ampliamente estudiado por su capacidad migratoria en respuesta a AMPc[123], que es equiparable a la migración de células de eucariotas superiores, como los leucocitos. La principal ventaja de *D. discoideum* es que se han generado la mayoría de los mutantes con ausencia de función de las proteínas que participan en los procesos de migración y se han analizado cuidadosamente sus fenotipos[77]. Por lo tanto, el análisis de las características migratorias de las células con expresión heteróloga de las construcciones de DGK podría ayudarnos a situar la actividad DGK en la vía de activación de Rac.

Para llevar a cabo el estudio se transfectaron células de *D. discoideum* con unas construcciones que codificaban la proteína silvestre DGKα y MyrGFPDGKα bajo el control del promotor de actina15, que permite la expresión durante todo el ciclo vital de *D. discoideum*[400]. No fuimos capaces de detectar la expresión de las proteínas de interés ni por WB ni por microscopía, en el caso de la fusionada a GFP, lo que nos impidió llevar a cabo el estudio (datos no mostrados). Posiblemente, las proteínas de interés no se expresaban a niveles detectables porque los ARN de transferencia que reconocen los codones característicos de mamíferos se encuentran en menor proporción y en algunos casos son inexistentes en *D. discoideum*[519].

4 GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS PARA Δ196DGKα Y DGKαINACTIVA

Como ya hemos descrito en la introducción tanto DGKα como DGKζ juegan un papel importante en la diferenciación y proliferación de los linfocitos T[362,417,555,556] probablemente por su capacidad de regular entre otras la actividad de RasGRP1[417,484]. Para intentar estudiar más en detalle esta función decidimos generar unos ratones transgénicos para una forma constitutivamente activa de DGKα (Δ196DGKα) o una forma inactiva (DGKαinactiva). La primera debería diluir los efectos derivados de la función de RasGRP1 u otros posibles efectores y la segunda exacerbarlos al aumentar los niveles de DAG. Con

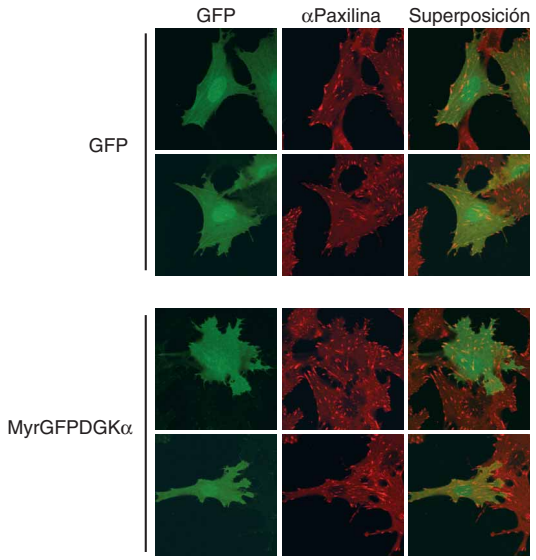


Figura R7 – Tinción de paxilina en células PAE transfectadas con pEFEGFP o pEF4-MyrGFPDGKα.
Se transfectaron células PAE con pEFEGFP o pEF4-MyrGFPDGKα según se indica. Se crecieron durante 24 h sobre cubreobjetos y se fijaron con PFA4% para la posterior inmunodetección (ver materiales y métodos) de los contactos focales con un anticuerpo específico contra paxilina. En verde se muestra la localización de las construcciones, en rojo la tinción con paxilina y en el panel de la derecha la superposición de ambos colores. Las imágenes seleccionadas son representativas de los campos analizados en cada condición.

los posibles efectores de PA ocurriría lo contrario; la presencia de Δ196DGKα los activaría en mayor medida y la expresión de DGKαinactiva disminuiría su activación.

Para llevar acabo este proyecto se diseñaron dos construcciones que permitiesen la expresión de nuestros transgenes (ver materiales y métodos). Decidimos utilizar un promotor que dirigiese la expresión a tejido linfoide y más concretamente a timocitos y células T maduras, el promotor de CD2. Usamos este promotor en lugar del más habitual, que suele ser la región proximal del promotor de Lck, porque presenta varias ventajas. En primer lugar, controla la expresión en periferia de forma sostenida y en segundo, esta expresión es dependiente del número de copias insertadas y no de la posición de la inserción, ya que se conoce con exactitud su LCR o región controladora de locus[66].

El vector utilizado Va-hCD2[558] contiene en su extremo 5´ 5 Kb correspondientes al promotor de CD2 y en el extremo 3´, 5,5 Kb de la región LCR. La diana para el clonaje, EcoRI, está situada en el intrón 1 de CD2 y en lo que será el extremo 3´ del transgén hay dos señales de poliadenilación de la región 3´ no traducida de CD2. Todas estas secuencias está insertadas en el vector pBlueScript, para permitir su amplificación en bacteria, y al cortar con SalI y NotI se puede liberar todo el conjunto para proceder a la microinyección.

La descendencia resultante de la microinyección se analizó por PCR (FigR8). A partir de un fragmento de cola de los ratones se extrajo ADN (ver materiales y métodos) y se analizó su estado con unos oligonucleótidos control que amplifican una porción de un gen endógeno, en este caso TSH. Una vez comprobado que el ADN no está degradado se realizaron varias PCRs con distintas parejas de oligonucleótidos que amplifican en el caso de que se haya producido la inserción del transgén de interés en el genómico del individuo en estudio. Tras analizar 49 individuos para Δ196DGKα y 53 para DGKαinactiva, sólo pudimos detectar un fundador en el caso de Δ196DGKα, el macho #47 (FigR9A). Este individuo se cruzó sucesivas veces y se analizó su descendencia por PCR y Southern blot para poder determinar el número de inserciones y el número de copias insertadas (FigR8). Una vez más se obtuvo ADN a partir de las colas de los individuos a analizar y se comprobó su integridad en geles de agarosa. Una vez comprobado que no había sufrido degradación se digería con EcoRI y las muestras se analizaban por SB usando una sonda que reconocía todo el transgén y una porción a ambos lados correspondiente al promotor de CD2 o su región controladora de locus. El uso de esta sonda nos permitía distinguir entre una o varias copias insertadas y una o varias inserciones. El patrón que detectábamos indicaba una única inserción con al menos dos copias: 1.8 Kb, corresponde con el tamaño del transgén Δ196DGKα, 11 Kb, es la banda esperada en el caso de que se hayan insertado varias copias seguidas y sólo hay dos bandas de tamaño no predicho que son indicativas de un único punto de inserción.

Varios de los ratones analizados por PCR y SB fueron sacrificados para estudiar la expresión del transgén. No fuimos capaces de detectar la presencia del transgén por WB en muestras procedentes de timo, bazo o ganglio (FigR9B y datos no mostrados) a donde se había dirigido la expresión con el promotor de CD2. Dado que en aquellos momentos en el laboratorio no disponíamos de buenos anticuerpos contra DGKα decidimos analizar si detectábamos cambios en la actividad DGK en muestras procedentes de timo, bazo o ganglio (FigR9B y datos no mostrados). Tampoco fuimos capaces de detectar ninguna diferencia lo que indicaba que el punto de inserción de nuestro transgén dificultaba o impedía su expresión.

Aunque se pudo establecer una línea transgénica para Δ196DGKα ninguno de los ratones analizados expresaba la proteína ni mostraba aumentos de actividad DGK en los tejidos en los que el promotor de CD2 permitía la expresión.

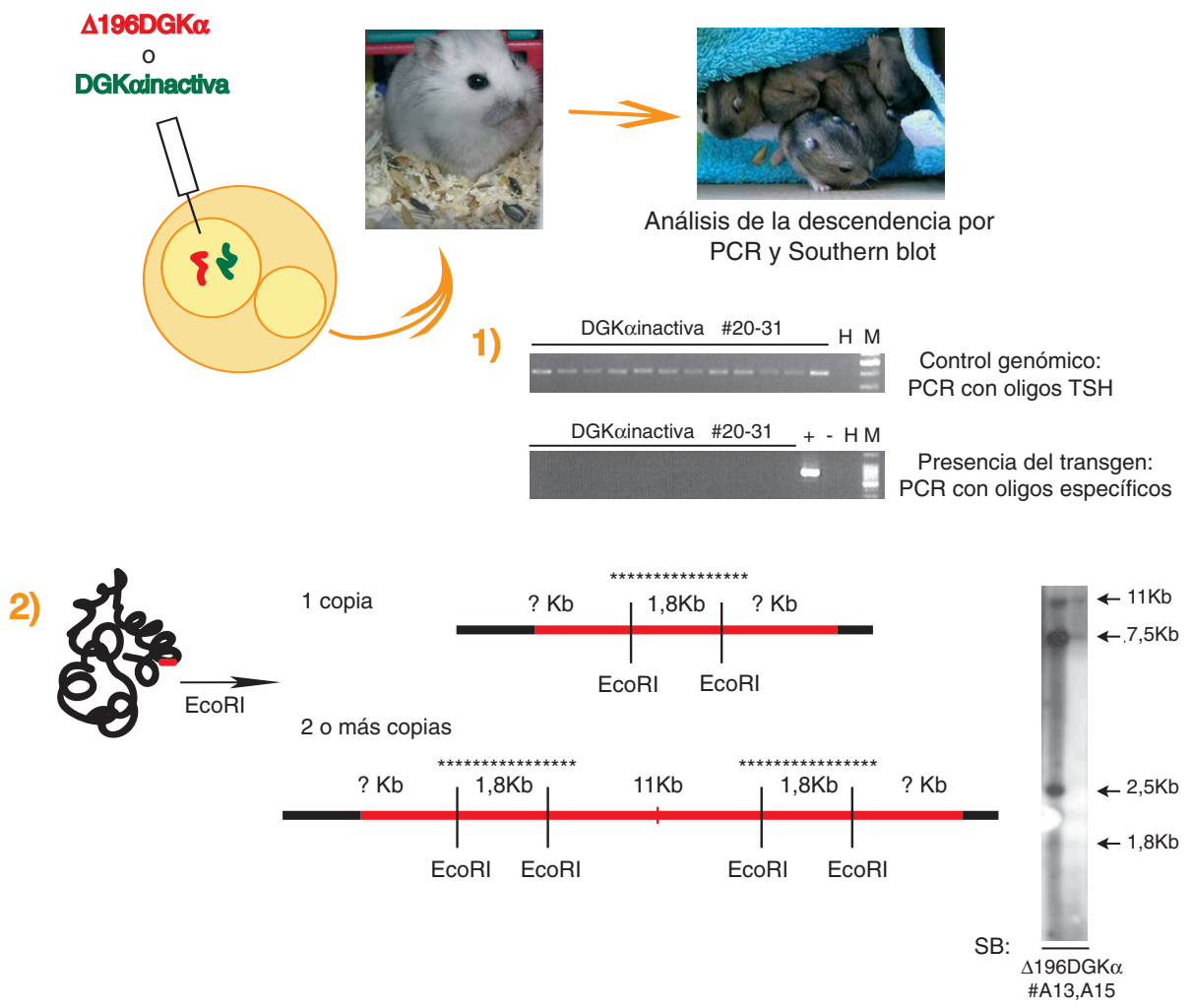


Figura R8 – Esquema de la producción y análisis de transgénicos para una forma inactiva o constitutivamente activa de DGKα.
Se prepararon las dos construcciones de transgénesis (ver materiales y métodos) para su microinyección en el pronúcleo femenino de oocitos fecundados de la cepa B6CBA. Estos oocitos se introducen en ratonas preparadas, que permitirán su gestación, y las camadas resultantes se analizan por PCR o Southern blot (SB) usando el ADN obtenido de las colas seccionadas de los ratones (ver materiales y métodos). En el caso de la PCR (1) se muestra a modo de ejemplo el análisis de los ratones 20 al 31 de la primera microinyección de DGKαinactiva. M: marcador de peso molecular; H, control negativo sin ADN; -, control negativo con ADN de un ratón silvestre; +, control positivo con el plásmido que contiene el transgén. Para el análisis por SB (2), tras comprobar la integridad del ADN genómico, se procedió a su digestión con EcoRI que genera el patrón mostrado al cortar sobre nuestro transgén, en función del número de copias integrado y su posición. En rojo se indica el ADN de nuestro transgén y en negro el resto del ADN genómico; con los asteriscos se muestra la zona de hibridación de la sonda que se generó para el análisis. Se muestra a modo de ejemplo el resultado del SB de dos de los ratones analizados para estudiar la presencia del transgén Δ196DGKα.

A

	Nº fundadores	Nº inserciones
Δ196DGKα	1/49	Detectamos una y con varias copias
DGKαinactiva	0/31 0/22	-

El individuo fundador era macho y se cruzó para obtener descendencia y poder establecer una línea.

A1-A82

Análisis de la descendencia por PCR, SB, WB y ensayos de actividad.

B

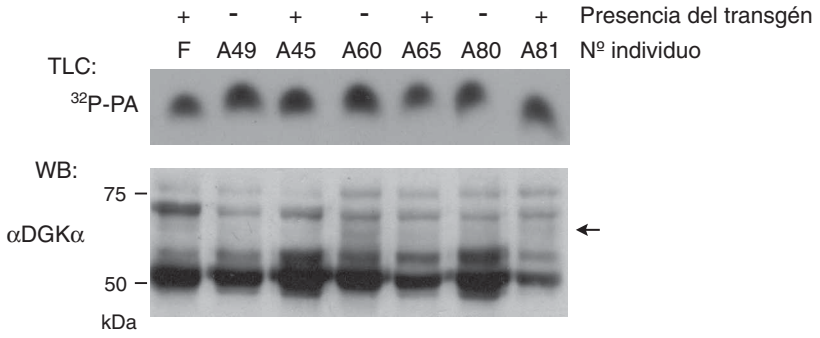


Figura R9 – Análisis de la expresión del transgén en la línea de transgénicos para Δ196DGKα.
A – Tabla resumen de las tres microinyecciones que se realizaron para la obtención de transgénicos de Δ196DGKα y DGKαinactiva.
B – Se seleccionaron, además del fundador (F), varios individuos de la línea establecida para Δ196DGKα en los que se detectó (+) o no (-) el transgén por PCR y SB. Estos individuos se sacrificaron para analizar la expresión del transgén en timo, bazo y ganglio. A modo de ejemplo se muestra el resultado de los extractos celulares obtenidos a partir de los timos. Estos extractos se utilizaron para realizar un ensayo de actividad DGK en presencia de un sustrato exógeno, C8-DAG, y [γ-^{32}P]ATP y además se resolvieron por SDS-PAGE en condiciones reductoras para su posterior análisis por WB con un anticuerpo específico contra DGKα que no reconoce la proteína endógena de ratón. Con una flecha se indica la posición que debería ocupar Δ196DGKα.

ESTUDIO DE LOS DOMINIOS C1 COMO BIOSENSORES DE DAG

El trabajo experimental que hemos descrito hasta ahora consistió en intentar modificar los niveles de DAG y/o PA usando distintas formas de DGKα y en diferentes contextos celulares. Dado que tanto el sustrato como el producto de la reacción de DGK son segundos mensajeros lipídicos, necesitábamos distinguir entre las consecuencias de los cambios de DAG y de los de PA. En este sentido, para poder estudiar dónde, cómo y para qué se produce el DAG en nuestros sistemas modelo, decidimos generar unos sensores de DAG.

Los dominios C1 son los mejores candidatos para detectar cambios en los niveles de DAG ya que son los encargados de la unión de este lípido en las proteínas que los contienen[378]. Este tipo de sensores ya se han utilizado previamente[351] pero nosotros queríamos comprobar su potencial para llevar a cabo estudios de vídeo-microscopía en linfocitos T, células en que las variaciones de DAG son esenciales para su desarrollo y supervivencia[416,556].

1 CLONAJE Y EXPRESIÓN DE VARIOS DOMINIOS C1

Para generar estos sensores clonamos los dominios C1 de varias proteínas que se expresan en linfocitos y los fusionamos a GFP para poder hacer nuestro estudio usando técnicas de vídeo-microscopía. Los dominios C1a y C1b de PKCθ se clonaron de forma independiente o en tándem (C1aPKCθ, C1bPKCθ y C1a+C1bPKCθ). También se usaron los dominios C1 de RasGRP1 y β2Quimerina (C1RasGRP1 y C1β2Quimerina). Estos dominios, como se muestra en su

alineamiento con un C1 bien caracterizado, el dominio C1b de PKCδ[242,550] (FigI4), conservan los residuos que se han descrito como esenciales para la unión de DAG[242].

Diseñamos diferentes oligonucleótidos (ver materiales y métodos) que nos permitieron amplificar los 50 residuos característicos de los dominios C1, más 3 adicionales en cada extremo que permitirían un plegamiento correcto de la proteína. Generamos construcciones con GFP fusionada tanto al extremo N-terminal como al C-terminal y su expresión y comportamiento fue el mismo.

Se analizó la expresión de los distintos dominios en células Jurkat. Las imágenes de confocal (FigR10A) mostraron diferente localización de cada dominio C1. C1aPKCθ se distribuía de forma homogénea por toda la célula. C1bPKCθ y C1β2Quimerina se acumulaban especialmente en la región perinuclear aunque con una señal difusa en el citosol y nucleoplasma. C1RasGRP1 mostraba la misma señal que C1bPKCθ y C1β2Quimerina en el entorno del núcleo y además se distribuía de forma reticulada por el citoplasma. En el caso de C1a+C1bPKCθ se encontró predominantemente en las membranas plasmática y perinuclear. En el análisis por WB (FigR10B) todas las construcciones se resolvieron en el peso esperado y mostraron una elevada expresión excepto en el caso de C1a+C1bPKCθ.

Cada uno de los dominios C1 estudiados, C1β2Quimerina, C1aPKCθ, C1bPKCθ, C1a+C1bPKCθ y C1RasGRP1 tiene una localización subcelular diferente.

A) Estudio de la localización subcelular de los dominios C1.

Para comprobar si la señal interna que obteníamos con los dominios C1 correspondía con alguna de las estructuras celulares que se encuentran en la región perinuclear, se realizaron tinciones con anticuerpos específicos para Golgi, anti-gigantinaα[427], o para RE, anti-PDI[133] (FigR11). En el caso de la tinción de Golgi sí pudimos detectar colocalización en las zonas de máxima acumulación de las construcciones de C1β2Quimerina, C1bPKCθ, C1a+C1bPKCθ y C1RasGRP1. La tinción de PDI, aunque perinuclear, parecía ser más externa que la señal de GFP por lo que usamos un anticuerpo contra laminina[152] para detectar una posible colocalización con la membrana nuclear. Tampoco en este caso pudimos observar la asociación (datos no mostrados).

La señal reticulada en el citosol de la construcción de C1RasGRP1 sin embargo, sí muestra una colocalización parcial con la tinción de PDI.

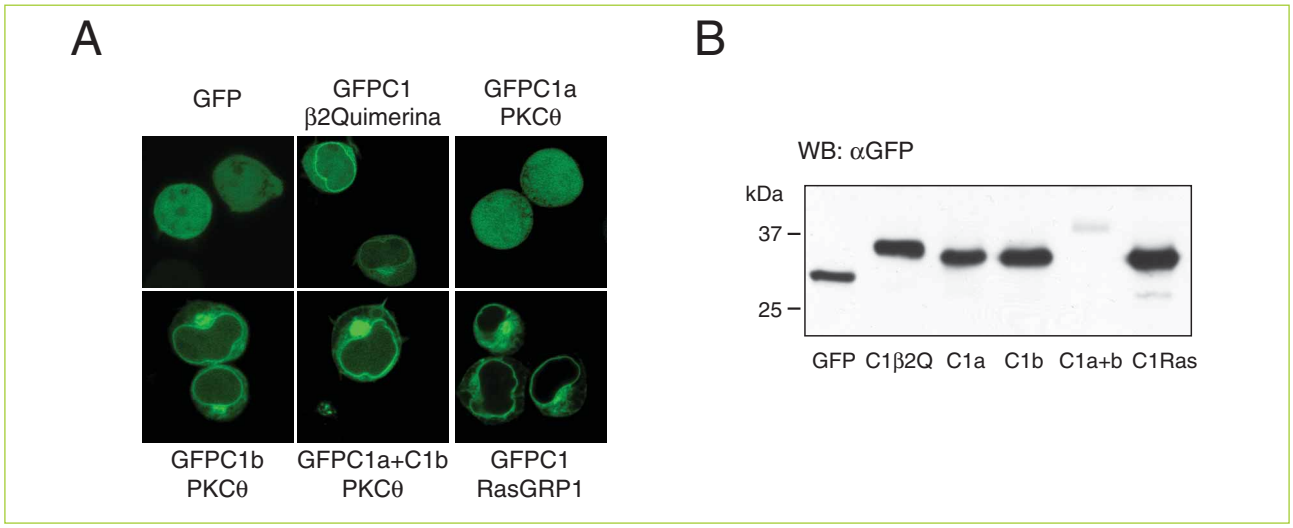


Figura R10 – Expresión de los dominios C1 en células Jurkat
Se transfectaron células Jurkat con las construcciones de los distintos dominios C1 fusionados a GFP.
A – Pasadas 24h se recogieron las células y se resuspendieron en HBSS para depositarlas sobre cámaras de microscopía recubiertas con poli-D,L-lisina. Estas cámaras se montaron en el microscopio confocal a 37ºC y se procedió al análisis de las diferentes muestras. Las imágenes mostradas son representativas de los campos observados en cada condición.
B – Tras 24h desde la transfección las células se recogieron y se lisaron. Los extractos celulares se cuantificaron para posteriormente resolverlos por electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras y analizarlos por WB con un anticuerpo específico contra GFP. La expresión de C1a+C1bPKCθ era menor que la de las otras construcciones en todos los experimentos realizados. El análisis por citometría de flujo demostró que las células que expresan GFPC1a+C1bPKCθ son menos numerosas y menos brillantes que aquellas que expresan las otras construcciones.

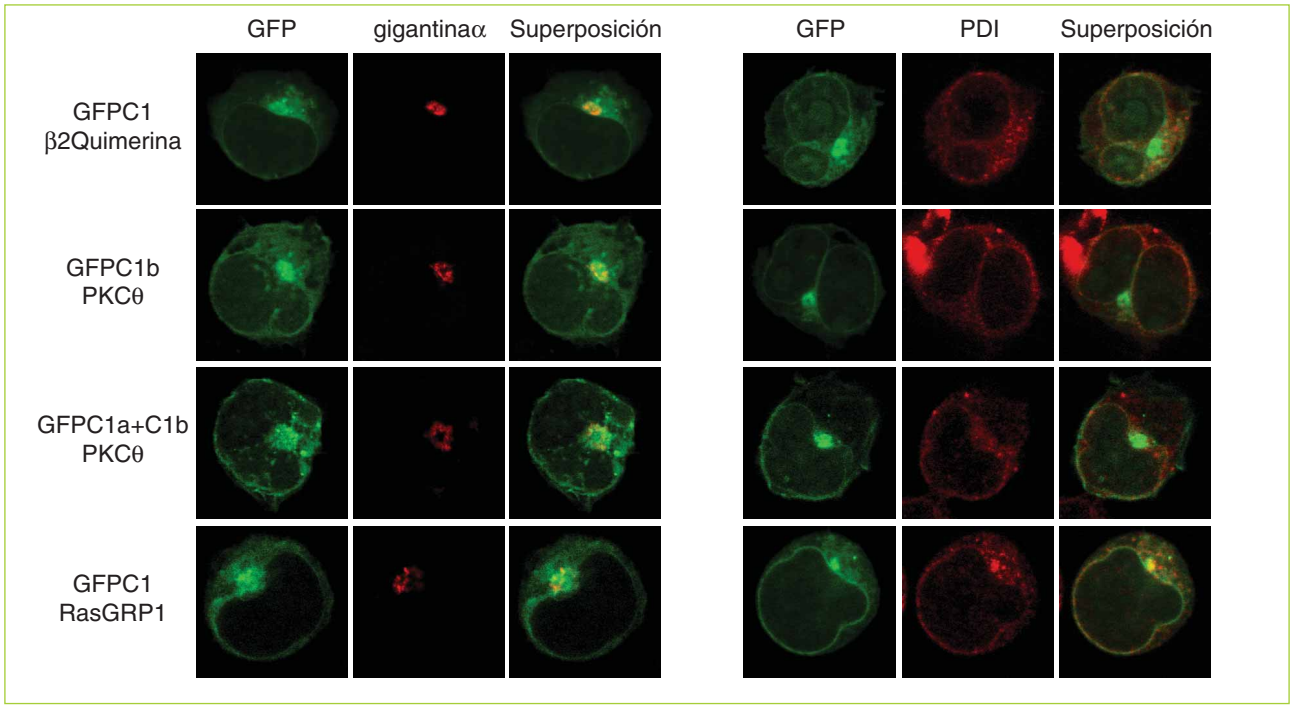


Figura R11 – Análisis de la localización interna de los dominios C1 por microscopía confocal.
Se transfectaron células Jurkat con los distintos dominios C1 fusionados a GFP. Pasadas 24 horas las células fueron fijadas con PFA2% y procesadas (ver materiales y métodos) para detectar por inmunofluorescencia el aparato de Golgi por tinción con αgigantinaα (en rojo en los paneles de la izquierda) o el retículo endoplásmico usando αPDI (en rojo en los paneles de la derecha). Se muestra la superposición de los canales Cy2 y Cy3. Las imágenes mostradas son representativas de los campos estudiados en cada condición.

La localización subcelular de los dominios C1 corresponde parcialmente con el aparato de Golgi y en el caso de C1RasGRP1 también con el retículo endoplásmico.

El DAG es uno de los principales sustratos en la generación de lípidos complejos que tiene lugar en el RE y en el aparato de Golgi[178], y por lo tanto se debe acumular en estas localizaciones para ser procesado. También contribuye a la generación de DAG la actividad PLC tanto en membranas internas como plasmática[382]. Para comprobar si el DAG derivado de cualquiera de estas dos rutas podría ser responsable de la localización de las construcciones de los dominios C1 se utilizaron dos inhibidores, U73122 y propranolol.

El U73122 es un inhibidor genérico de la PLC que al bloquear la hidrólisis del PI4,5P_2 disminuye los niveles de DAG[478]. Al tratar las células Jurkat durante 30 minutos con este inhibidor los dominios C1β2Quimerina, C1bPKCθ y C1a+C1bPKCθ pierden su localización y en el caso de la construcción de C1RasGRP1 aunque pierde parte de la señal perinuclear mantiene una localización interna residual (FigR12A).

El propranolol es un inhibidor específico de la fosfohidrolasa de fosfatídico tipo I (PAPI), enzima encargada de la defosforilación del PA tanto en el citosol como en membranas internas[396]. Este inhibidor ha sido usado ya anteriormente para bloquear la producción de DAG[29,266]. La adición de propranolol a las células provoca la disociación de los dominios C1 estudiados en menos de 1 minuto y su relocalización en el citoplasma, excepto en el caso de C1a+C1bPKCθ, que mantiene cierta señal residual en la membrana plasmática (FigR12B y vídeos suplementarios 1-4).

La localización subcelular de los dominios C1 es dependiente de DAG.

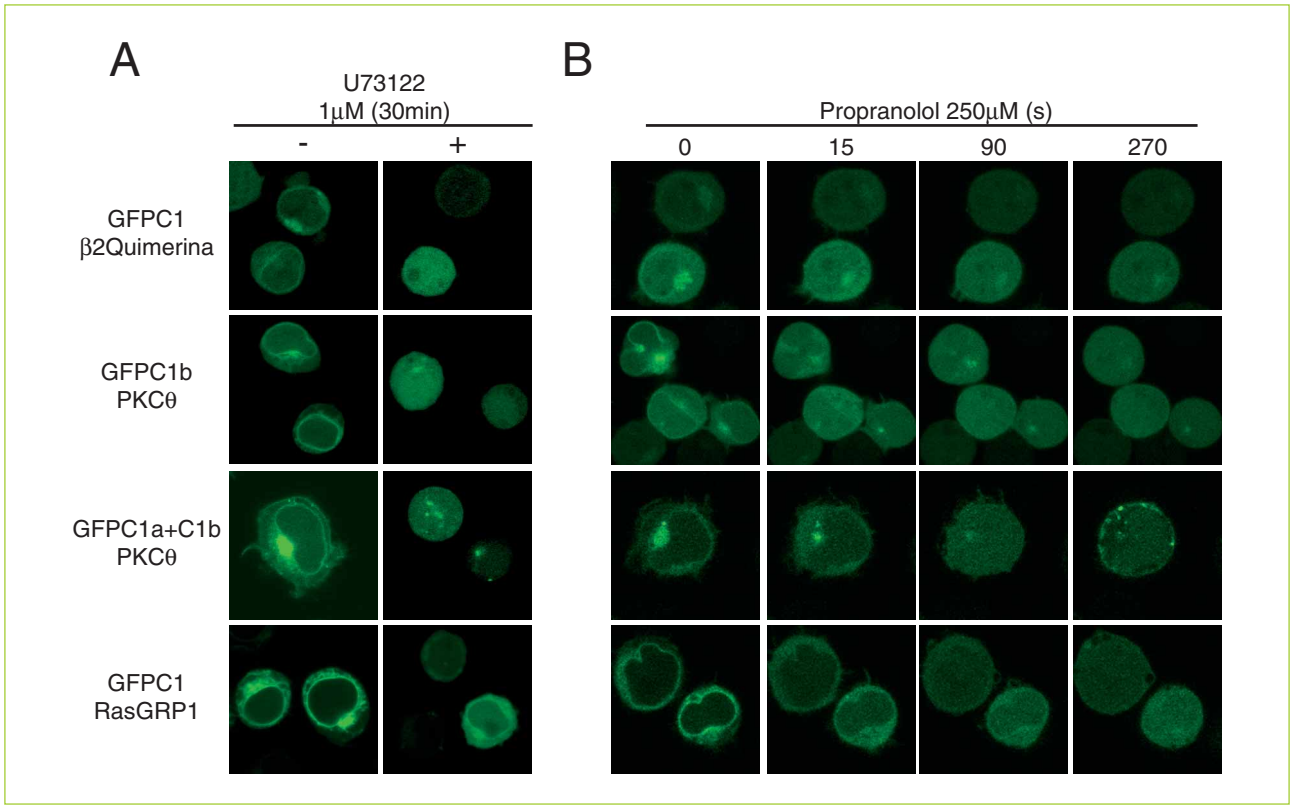


Figura R12 – Localización de los dominios C1 en células Jurkat tratadas con U73122 o propranolol.
Se transfectaron células Jurkat con las construcciones de los dominios C1 indicadas.
A – Tras 24 horas en cultivo las células fueron tratadas (+) o no (-) con U73122 1μM durante 30 min. Se centrifugaron y recuperaron en HBSS -/+ U73122 para analizarlas en el microscopio confocal como se indica en la figura R10A.
B – Pasadas 24 horas desde la tranfección las células se recuperaron en HBSS y se depositaron sobre cámaras de microscopía para proceder al análisis. Tras la captura de la primera imagen (t=0) se añadió propranolol (250 μM) y las imágenes sucesivas fueron capturadas cada 5s. Se seleccionaron varias imágenes a los tiempos indicados para mostrar la localización subcelular de las construcciones. Los vídeos suplementarios 1-4 muestran la grabación completa.

B) Estudio de la interacción con membranas de los distintos dominios C1 mediante ensayos in vitro de unión a vesículas.

La localización diferencial de los dominios C1 a membranas concretas indicaba que esta distribución además de necesitar la presencia de DAG debía depender de otros componentes específicos de cada tipo de membrana. En este sentido se ha descrito que las membranas plasmática e internas difieren en su composición lipídica, estando la primera enriquecida en fosfatidilserina y colesterol y las segundas en fosfatidilcolina[453,559]. Para analizar si esta distinta composición podía explicar la localización de los dominios C1, generamos vesículas que mimetizaban las membranas nuclear o plasmática[97]. Se incubaron los lisados de las células Jurkat transfectadas con los distintos dominios C1 o GFP (control) con las vesículas. Se analizó la cantidad de proteína que se unía a cada tipo de vesícula por WB. En estas condiciones se detectó una mayor asociación a las vesículas que simulaban la membrana plasmática en todos los dominios C1 estudiados, excepto en el caso de C1a+C1bPKCθ que tiene mucha afinidad por las membranas y se une de forma similar y prácticamente en su totalidad a los dos tipos de vesícula (FigR13). Estos resultados no podían explicar la diferencia en la localización subcelular que habíamos detectado por microscopía.

Los dominios C1 se unen a vesículas que simulan la composición de la membrana plasmática en mayor proporción que a aquellas que mimetizan la membrana nuclear.

Otra posible explicación para las distribuciones que observamos es que los dominios C1 se estuviesen asociando con diferentes especies de DAG. Un alto

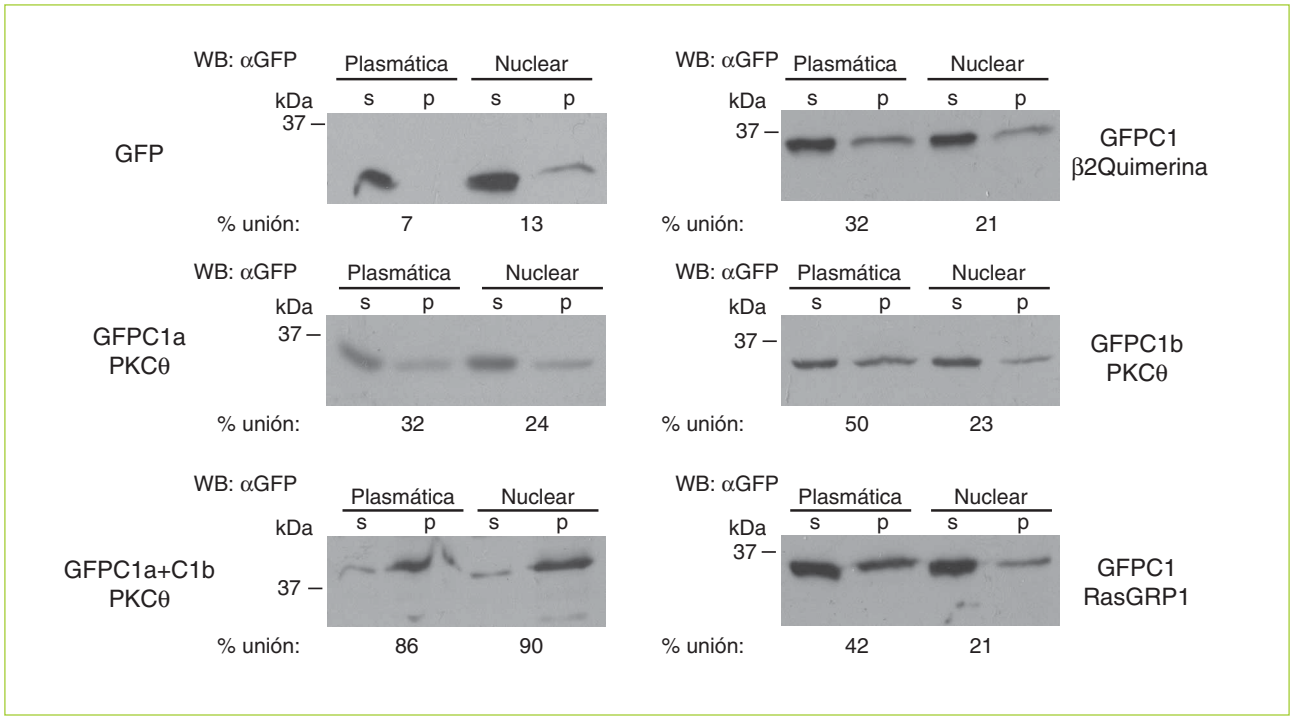


Figura R13 – Unión in vitro de los dominios C1 a vesículas que mimetizan la composición lipídica de la membrana plasmática o nuclear. Se generaron vesículas (ver materiales y métodos) con los siguientes componentes: POPC:POPE:POPS:POPI:Colesterol en distinta proporción (mol:mol) para simular membrana plasmática (12:35:22:9:22) o nuclear (61:21:4:7:7). Estas vesículas se incubaron con los lisados de células Jurkat transfectadas con los distintos dominios C1 o GFP como control. Esta mezcla se centrifugó para aislar la proteína unida (p) de la no unida (s). Posteriormente ambas fracciones se resolvieron por electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras y se analizaron por WB con un anticuerpo específico contra GFP. Las autoradiografías obtenidas se utilizaron para realizar un análisis densitométrico de las bandas de interés y calcular el porcentaje de proteína unida a las vesículas siguiendo la siguiente fórmula: %unión = intensidad de la banda en p/(intensidad de la banda en p + intensidad de la banda en s).

porcentaje del DAG de las membranas internas contiene ácidos grasos monoinsaturados o saturados, mientras que en la membrana plasmática el DAG, en la mayoría de los casos, presenta en la posición 1 de la cadena de glicerol un ácido graso saturado y en la posición 2 un ácido graso poliinsaturado[183]. Para simular estos dos contextos, generamos vesículas multilamelares con una base de DPPC y PS (4:1, mol:mol) a la que incorporamos DOG (2,5 μM) como ejemplo de DAG de membrana interna, o SAG (2,5 μM) como DAG de membrana plasmática. Se transfectaron células Jurkat con las diferentes construcciones de los dominios C1 o GFP como control. Estas células se procesaron y los lisados se usaron para incubarlos con las vesículas durante 15 minutos. La proteína unida en cada condición se analizó por WB. (FigR14). De nuevo pudimos detectar que la construcción de C1a+C1bPKCθ se asocia prácticamente en su totalidad con cualquier tipo de vesícula. En el caso de C1β2Quimerina y más aún, en el de C1bPKCθ se pudo observar mayor unión a las vesículas que contienen SAG, mientras que el C1RasGRP1 se asocia mejor con las vesículas que contienen DAG similar al de las membranas internas (DOG). La construcción de C1aPKCθ a pesar de no aparecer asociada con ningún tipo de membrana por microscopía en células intactas, parece unirse de forma no específica a las vesículas en estos ensayos in vitro (FigR13,R14).

Los dominios C1 se unen diferencialmente a distintas especies de DAG

C) Búsqueda de los residuos implicados en la especificidad de unión a membranas.

Se ha estudiado con mucho detalle cuál es el papel que realiza cada aminoácido de los 50 que constituyen el dominio C1 en la unión a DAG, la interacción con membranas o el mantenimiento del plegamiento necesario para la unión[187,192,242,515,532,550]. Considerando esta información, analizamos la secuencia primaria de los dominios C1 que muestran más diferencias en cuanto a

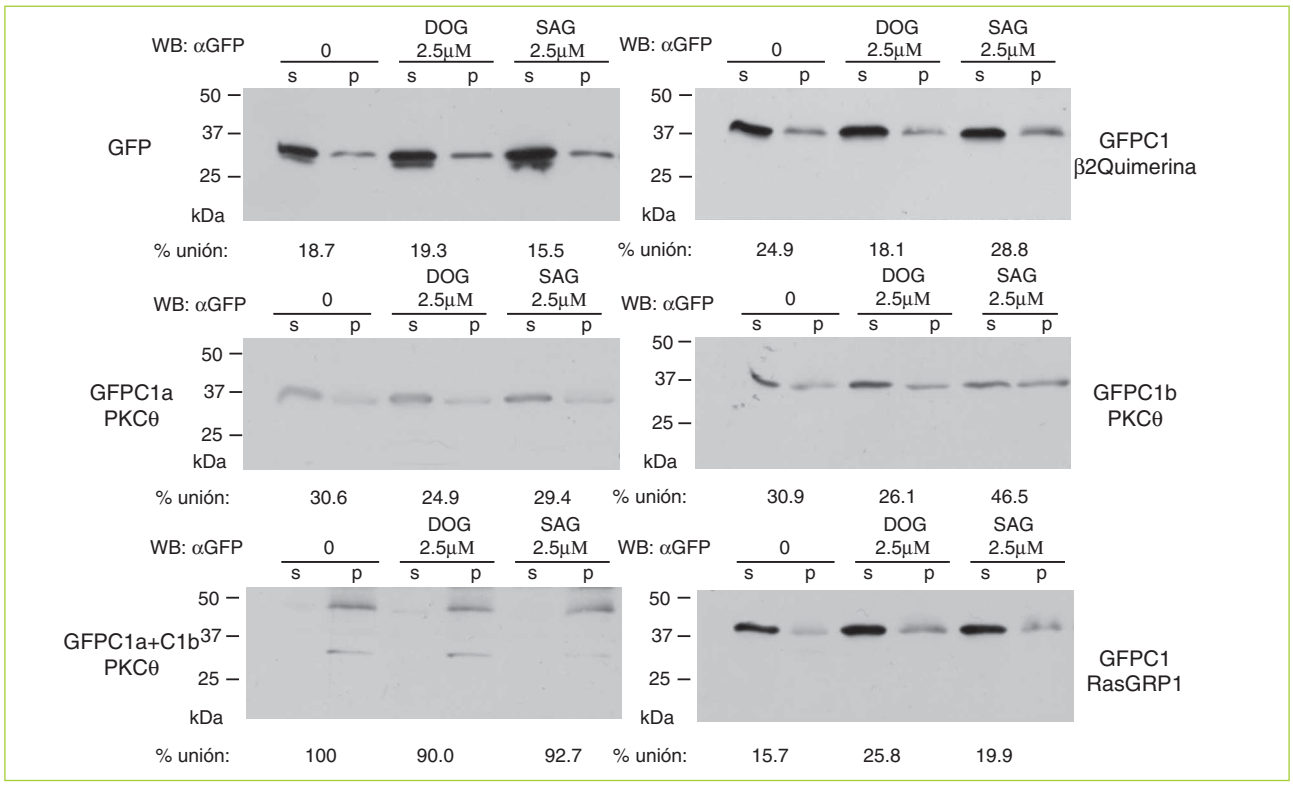


Figura R14 – Unión in vitro de los dominios C1 a vesículas que contienen distintas especies de DAG.
Se generaron vesículas (ver materiales y métodos) de DPPC y PS (4:1, mol:mol) que no contienen DAG (0) o contienen 1,2-dioleil-sn-glicerol (DOG) o 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicerol (SAG). Estas vesículas se incubaron con los lisados de células Jurkat transfectadas con los diferentes dominios C1 y la mezcla se procesó, analizó y cuantificó como en la figura R13. Se representa el porcentaje de unión siguiendo la fórmula: % de unión = intensidad de la banda en p/(intensidad de la banda en p + intensidad de la banda en s).

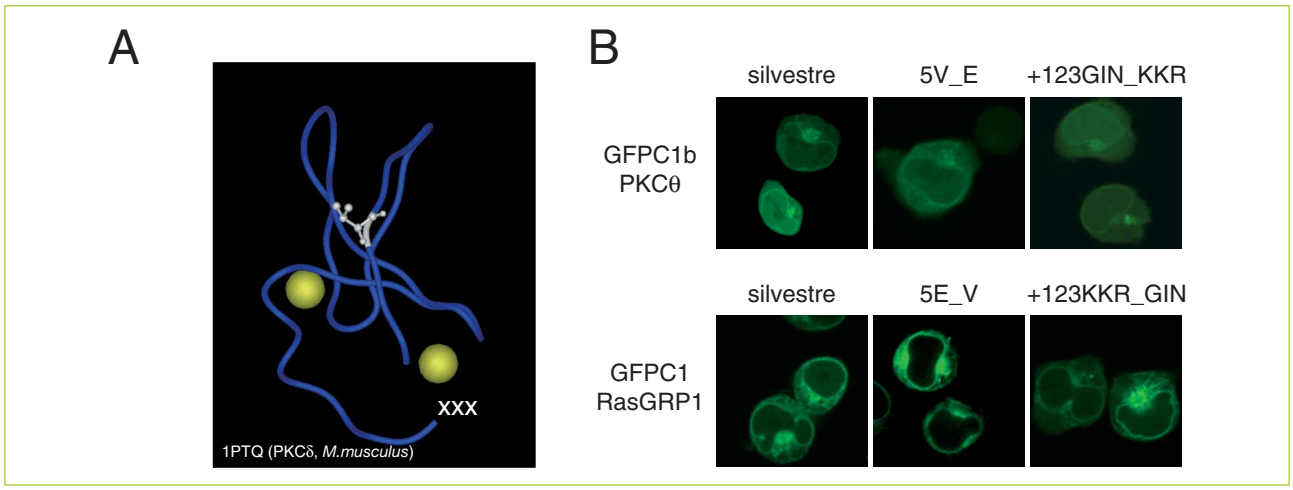


Figura R15 – Localización de los mutantes C1bPKCθ 5V_E y +123GIN_KKR y C1RasGRP1 5E_V y +123KKR_GIN en células Jurkat.
A – Representación del cristal del dominio C1b de PKCδ (PDB ID:1PTR). Se muestra en blanco y en representación de varillas y esferas la posición 5, ocupada en C1bPKCθ por una valina y en C1RasGRP1 por un ácido aspártico. Con unas X los tres residuos que siguen al dominio C1 en su extremo carboxilo. En amarillo los iones de Zn^{2+}.
B – Se transfectaron células Jurkat con las construcciones C1bPKCθ y C1RasGRP1 silvestres y los mutantes C1bPKCθ 5V_E y +123GIN_KKR y C1RasGRP1 5E_V y +123KKR_GIN. 24 h después de la transfección las células fueron procesadas como en la figura R10A para su análisis por microscopía confocal. Las imágenes muestran la localización subcelular de los dos dominios C1 y sus mutantes. Las imágenes mostradas son representativas de los campos observados en cada condición.

su localización y unión a vesículas, C1bPKCθ y C1RasGRP1. En la posición 5 del dominio[242], implicada en la estabilización de los residuos que coordinan el segundo ión de Zn^{2+} (en amarillo en la FigR15A), encontramos una diferencia de carga (FigI4) que podría explicar las variaciones detectadas. Para confirmar esta posibilidad se cambió el ácido glutámico por una valina en C1RasGRP1 y la valina de C1bPKCθ por un ácido glutámico. Estos mutantes no presentaron ningún cambio en términos de localización (FigR15B).

El C1RasGRP1 presenta en las posiciones 1, 2 y 3 (+123, marcadas con X en la FigR15A) después de los 50 residuos típicos del dominio C1 una serie de residuos cargados positivamente que parecen estar implicados en incrementar la afinidad de este C1 por ésteres de forbol[210]. De hecho, estos residuos están conservados en todos los miembros de la familia de RasGRP y en el caso de RasGRP1 son esenciales para la capacidad transformante de la proteína completa en ensayos de focos[479]. Decidimos comprobar si el cambio de estos residuos en C1RasGRP1 (KKR) por los que están presentes en C1bPKCθ (GIN) y a la inversa provocaba alguna modificación en la localización de estos dominios (FigR15B). No se detectó ninguna alteración en los mutantes con respecto a los dominios C1 silvestres.

Las posiciones 5 y +123 de los dominios C1PKCθ y C1RasGRP1 no son relevantes para definir la localización de estos dominios C1.

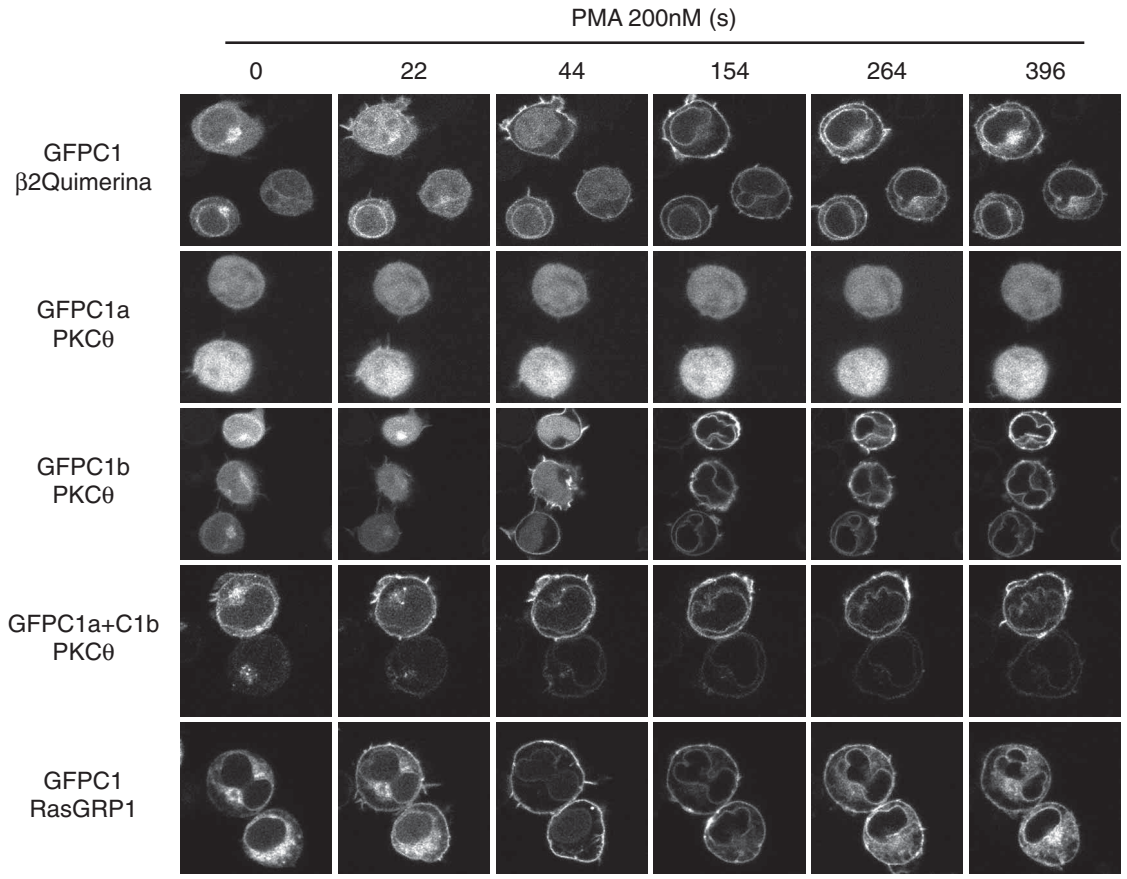


Figura R16 – Localización subcelular de los dominios C1 en respuesta a la adición de PMA en células Jurkat.
Se transfectaron células Jurkat con las distintas construcciones de los dominios C1 fusionados a GFP. 24h después las células se recogieron y se resuspendieron en HBSS para proceder a su análisis por microscopía confocal sobre cámaras de microscopía recubiertas con poli-D,L-lisina y a 37ºC. Se capturó una primera imagen (t=0s) e inmediatamente después se añadió PMA (200nM) para continuar la captura cada 11s. Se han seleccionado las imágenes a los tiempos indicados para mostrar la translocación de los dominios C1. Los vídeos suplementarios 5-9 contienen la grabación completa.

2 RESPUESTA DE LOS DOMINIOS C1 A LA ESTIMULACIÓN CON ÉSTERES DE FORBOL

Para confirmar que los dominios C1 que habíamos seleccionado se comportaban como C1 típicos y respondían a ésteres de forbol con cambios en su localización, analizamos su respuesta a la adición de PMA o PDBu por vídeo-microscopía en células Jurkat.

En presencia de PMA (FigR16 y vídeos suplementarios 5-9) C1aPKCθ no cambiaba su localización, ni siquiera a una concentración de 1mM, muy por encima de la usada normalmente (datos no mostrados). En el caso de C1bPKCθ y C1β2Quimerina su comportamiento era prácticamente el mismo: la fracción citosólica y la asociada a estructuras internas translocaba a membrana plasmática y unos minutos después la fracción nuclear se desplazaba a la membrana nuclear. C1RasGRP1 abandonaba las membranas internas tras la adición de PMA para localizar en la membrana plasmática y más tarde, gradualmente, ir ocupando las posiciones originales. C1a+C1bPKCθ estaba parcialmente en la membrana plasmática antes de la estimulación y en el momento de la adición de PMA la fracción que quedaba en el citosol y en el Golgi se reubicaba en la membrana plasmática donde se mantenía al menos durante 15 minutos (datos no mostrados).

C1aPKCθ no responde a la adición de PMA con cambios en su distribución intracelular. El resto de los dominios C1 estudiados sí.

En el caso de la estimulación con PDBu (vídeos suplementarios 10-14), C1aPKCθ, no translocaba y C1bPKCθ, C1a+C1bPKCθ y C1β2Quimerina translocaban simultáneamente a membranas internas y plasmática. C1RasGRP1 parecía no responder al estímulo manteniendo la misma distribución en membranas internas.

Estas diferencias entre PMA y PDBu probablemente se deben a la menor hidrofobicidad y tamaño de PDBu[351] que le permiten atravesar las membrana plasmática y alcanzar las membranas internas más rápidamente que al PMA. En el caso del PMA, primero quedará atrapado en la membrana plasmática durante un tiempo permitiendo la translocación de la fracción citosólica de los dominios C1 y posteriormente, irá acumulándose en las membranas internas hasta que se alcance un equilibrio entre membranas plasmática e internas. Este equilibrio se refleja en el reparto de los dominios C1 entre estas dos ubicaciones una vez pasados 6 minutos desde la estimulación.

C1aPKCθ y C1RasGRP1 no responden a la adición de PDBu con cambios en su distribución celular. El resto de los dominios C1 estudiados sí.

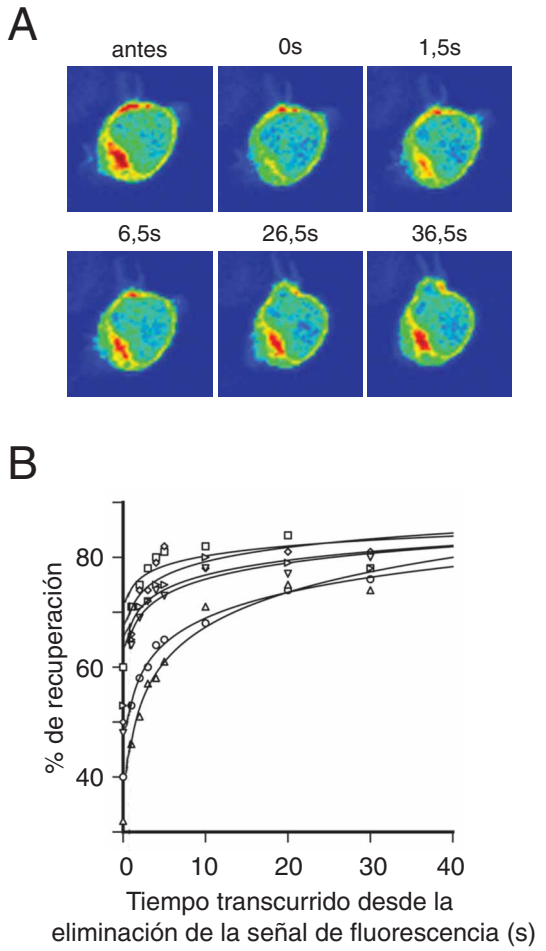


Figura R17 – Análisis por FRAP de la asociación a membranas internas del dominio C1RasGRP1.
Se transfectaron células Jurkat con el dominio C1RasGRP1. 24h después se recuperaron en HBSS y se depositaron sobre cámaras de microscopía manteniendo la temperatura a 37ºC.

A – Se seleccionó una región perinuclear y se eliminó su fluorescencia usando el láser a su máxima potencia. Se capturaron imágenes antes y después, a los tiempos indicados, para mostrar la recuperación de la fluorescencia en la zona seleccionada. El rango de colores utilizado es: rojo: máxima fluorescencia de GFP, azul: mínima fluorescencia de GFP.

B – Se representaron, en porcentaje de recuperación respecto a la fluorescencia original, los datos de seis experimentos representativos.

3 ANÁLISIS POR FRAP DE LA INTERACCIÓN DE C1RASGRP1 CON LAS MEMBRANAS

Aunque C1RasGRP1 parecía estar unido fuertemente a las membranas internas y no detectábamos señal ni en citosol ni en nucleoplasma, los experimentos de la adición de PMA sugerían una continua asociación y disociación con estas membranas. Para confirmar esta posibilidad se llevaron a cabo estudios de FRAP (FigR17) y se observó que después de seleccionar una zona de estudio y anular su fluorescencia, ésta comenzaba a recuperarse a los 500 milisegundos y era prácticamente igual a la inicial pasados 30 segundos.

C1RasGRP1 está continuamente asociándose y disociándose de las membranas internas.

4 RESPUESTA DE LOS DOMINIOS C1 AL INCREMENTO DE DAG PRODUCIDO POR LA ACTIVACIÓN DEL TCR

Para comprobar si los dominios C1 respondían al incremento de DAG que se produce en respuesta a la activación del TCR se estimularon células Jurkat, transfectadas con los distintos dominios, con microesferas recubiertas de αCD3 y αCD28. Las células que expresaban C1bPKCθ o C1a+C1bPKCθ mostraban una acumulación de la señal de GFP en la zona de contacto con la microesfera al igual que ocurría con la proteína completa, PKCθ (FigR18A). Sin embargo, al contrario que PKCθ, C1bPKCθ y C1a+C1bPKCθ no eran retenidos en la sinapsis inmunológica y con el paso del tiempo se dispersaban por toda la membrana plasmática (FigR19 y vídeos suplementarios 15-17). Como en el caso de la estimulación con PMA o PDBu, C1aPKCθ no translocaba a la zona de contacto (FigR18A).

La translocación de C1bPKCθ y C1a+C1bPKCθ en respuesta a αCD3+αCD28 era dependiente de DAG, ya

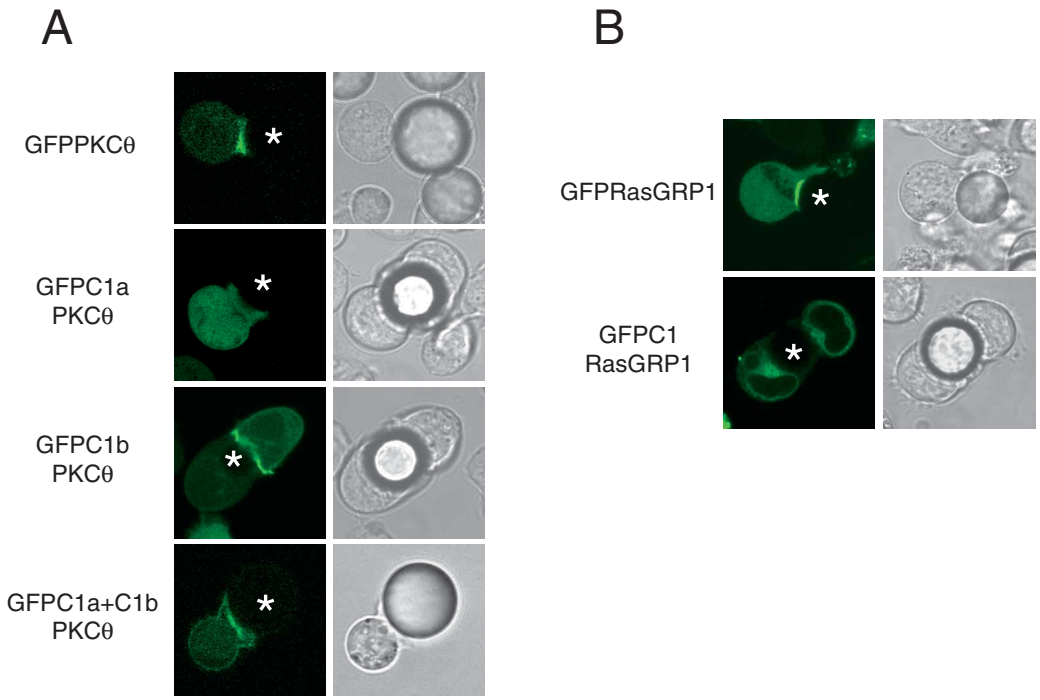


Figura R18 – Translocación de las proteínas completas PKCθ, RasGRP1 y sus dominios C1 en respuesta a la estimulación con microesferas recubiertas de αCD3+αCD28.
Se transfectaron células Jurkat con las construcciones fusionadas a GFP de PKCθ, C1aPKCθ, C1bPKCθ y C1a+C1bPKCθ (**A**) o RasGRP1 y C1RasGRP1 (**B**). 24 horas después de la transfección las células se recuperaron y resuspendieron en HBSS en presencia de microesferas recubiertas de αCD3+αCD28 en una proporción 1:1 célula:microesfera. Tras 15 minutos a 37ºC la mezcla se depositó sobre cámaras de microscopía y se analizaron todas las muestras por microscopía confocal. Con un asterisco se indica la posición que ocupa la microesfera. Las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

que en células tratadas con U73122, este desplazamiento no se producía (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con lo descrito hasta el momento de la translocación de PKCθ, que es dependiente de DAG y de otras señales que probablemente son las que retienen a la proteína en la sinapsis inmunológica[103,504].

El dominio C1aPKCθ no responde a los cambios de DAG que se producen en respuesta a la activación del TCR. Los dominios C1bPKCθ y C1a+C1bPKCθ, al igual que la proteína completa PKCθ, translocan a la sinapsis inmunológica pero no son retenidos en esta ubicación y se desplazan a lo largo de la membrana plasmática.

RasGRP1 es una proteína citosólica que se desplaza a la zona de contacto de la célula con la microesfera (FigR18B), sin embargo, en las mismas condiciones su dominio C1, C1RasGRP1, no transloca. Esto sugiere que aunque el C1 de RasGRP1 tiene una elevada afinidad por el Golgi, de alguna forma, la proteína completa tiene otros mecanismos que le permiten dirigirse a la membrana plasmática.

El dominio C1RasGRP1 no responde a la activación del TCR en términos de translocación, pero la proteína completa, RasGRP1, sí.

A) Efecto de la expresión de los dominios C1a+C1bPKCθ y C1RasGRP1 en la activación celular en respuesta a la estimulación del TCR.

El DAG que se produce en respuesta a la activación del TCR permite la activación de Ras y como consecuencia la fosforilación de ERK[318]. De hecho, la modificación de los niveles de DAG en presencia de una DGKα inactiva que no permite la transformación de DAG en PA y por lo tanto favorece su aumento, provoca una mayor activación de Ras[229].

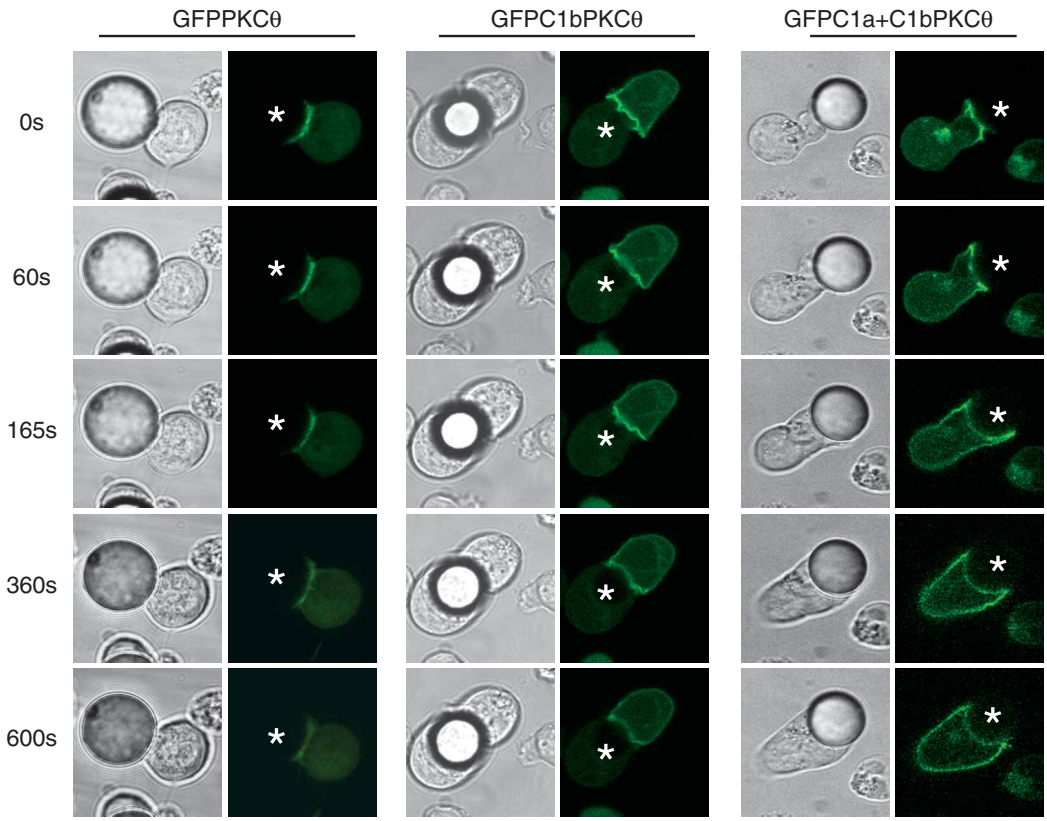


Figura R19 – Translocación de PKCθ, C1bPKCθ y C1a+C1bPKCθ en respuesta a microesferas recubiertas con αCD3+αCD28. Siguiendo el mismo procedimiento que en la figura R18 se estudió la localización subcelular de las construcciones por vídeo-microscopía. Se seleccionaron las imágenes a los tiempos indicados que muestran el movimiento de los dominios C1 frente a la proteína completa a lo largo de la membrana plasmática. Con un asterisco se indica la posición que ocupa la microesfera. Los vídeos suplementario 15-17 contienen todas las imágenes de la grabación.

Pudimos observar el efecto contrario cuando las células antes de proceder a su estimulación con αCD3 y αCD28 fueron tratadas con U73122. Al inhibirse la actividad PLC se bloquea la producción de DAG y Ca^{2+} y como consecuencia se produce una bajada en la activación de Ras, medida como su carga con GTP (FigR20, paneles superiores) y como fosforilación de ERK (FigR20, paneles inferiores). Quisimos comprobar si esta bajada en Ras-GTP también tenía consecuencias a nivel de otros de los efectores clásicos de Ras, Ral[129] y PI3K[399]. Para estudiar la actividad PI3K se analizó la fosforilación de AKT y para Ral su propia carga con GTP (FigR20). Las variaciones que detectamos en la fosforilación de AKT en presencia de U73122 no fueron significativas. Sin embargo, en el caso de Ral aunque la bajada en la cantidad de Ral-GTP a tiempos cortos (2 y 5 minutos) es pequeña, es totalmente reproducible.

La adición de U73122 previa a la estimulación del TCR bloquea la activación de Ras y de dos de sus efectores, Ral y la vía de Raf/Mek/Erk.

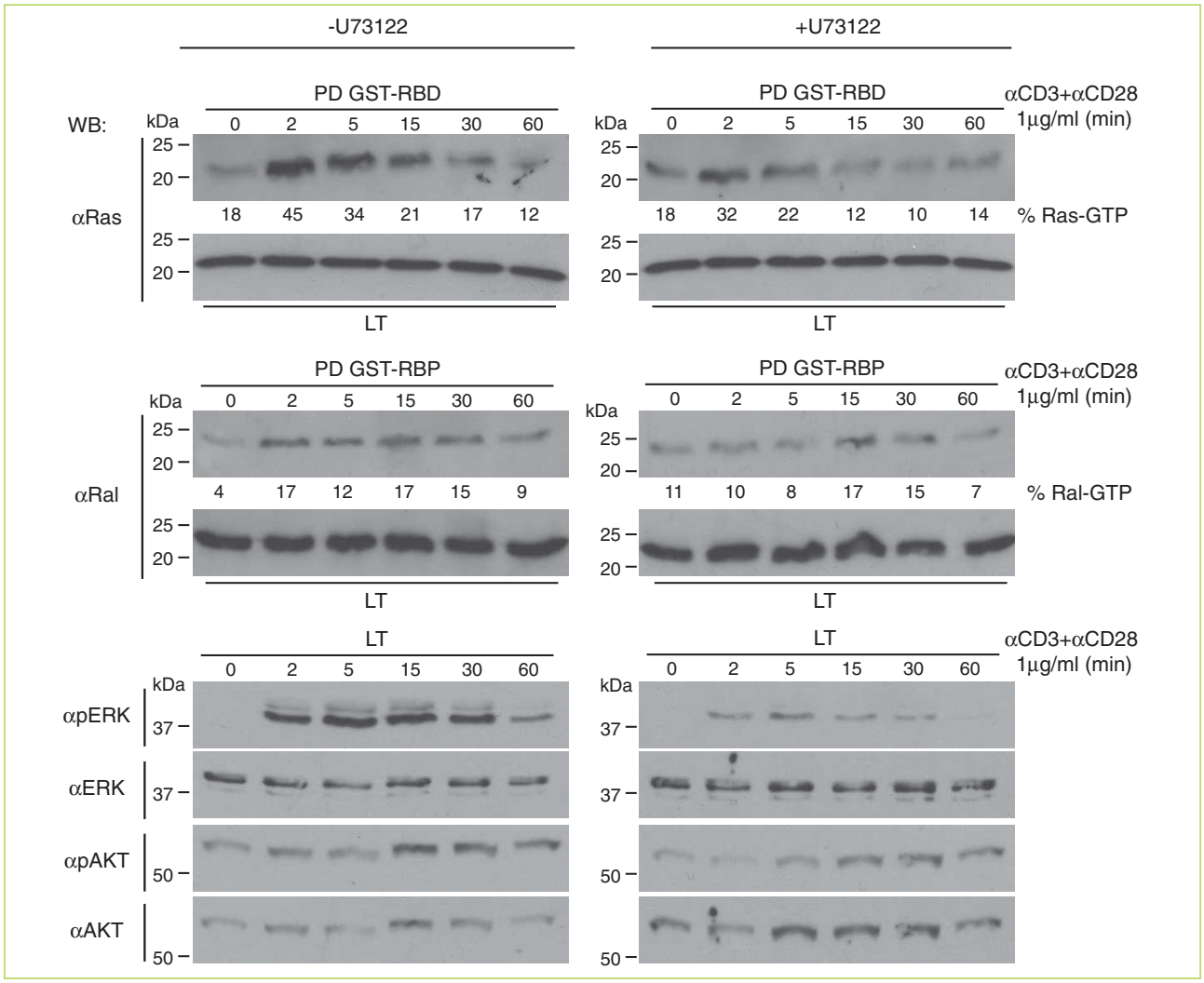


Figura R20 – Activación de Ras y sus efectores en respuesta a αCD3+αCD28 en células Jurkat tratadas con U73122.
Se recogieron células Jurkat creciendo de forma exponencial y se les retiró el suero durante 1h. A la mitad de las células se le añadió durante los últimos 20min U73122 (1μM) y se mantuvieron en presencia del inhibidor todo el ensayo. Se recogieron las células y se resuspendieron en HBSS (-/+ U73122) para proceder a la estimulación con αCD3+αCD28 (1 μg/ml cada uno) los tiempos indicados. Una vez recogidos todas las muestras las células se lisaron y los extractos obtenidos se cuantificaron para separar alícuotas para los controles de activación y lisado total (LT) o para incubar con GST-RBD o GST-RBP (PD) y detectar los niveles de Ras-GTP y Ral-GTP respectivamente (ver materiales y métodos). Todas las muestras se resolvieron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y se analizaron por WB con los anticuerpos indicados. Las autoradiografías se usaron para realizar un análisis densitométrico de las bandas de interés. Se expresa el nivel de carga con GTP de Ras y Ral en porcentaje respecto a la cantidad en el LT de Ras y Ral, respectivamente.

Si alterar los niveles de DAG con un inhibidor farmacológico como U73122 o con una DGK inactiva, puede afectar la activación de Ras en linfocitos, quisimos comprobar si los dominios C1a+C1bPKCθ y C1RasGRP1 pueden también alterar esta señalización dependiente de DAG, en términos de fosforilación de ERK. Se transfectaron células Jurkat con estos dominios y GFP como control; tras aislar las células positivas comparamos la fosforilación de ERK en respuesta a la adición de αCD3 (FigR21). En presencia de C1a+C1bPKCθ baja la fosforilación de ERK probablemente, porque al unirse al DAG de la membrana plasmática, bloquea la activación de las proteínas efectoras de DAG en esta localización, como RasGRP1. La expresión de C1RasGRP1 también modifica la fosforilación de ERK aunque en estas condiciones la construcción no transloca a la sinapsis. Estos resultados podrían confirmar los datos que postulan la activación de Ras en el Golgi a través de RasGRP1[40], ya que es en esta localización donde se mantiene C1RasGRP1 durante la activación.

Los dominios C1a+C1bPKCθ y C1RasGRP1 alteran la fosforilación de ERK en respuesta a la estimulación del TCR.

Los dominios C1 estudiados tienen una localización intracelular característica de cada uno de ellos y dependiente de la unión a DAG de distintas especies. Además, todos ellos, a excepción de C1aPKCθ, se comportan como dominios C1 típicos y responden a la adición de ésteres de forbol. En el caso de incrementos de DAG más controlados, como la activación del TCR, sólo C1bPKCθ y C1a+C1bPKCθ responden con cambios en su localización. Esta capacidad de unir DAG de los dominios C1 les confiere además, la posibilidad de secuestrarlo e impedir que actúe sobre sus efectores, como hemos visto en el caso de células que expresan C1a+C1bPKCθ y C1RasGRP1.

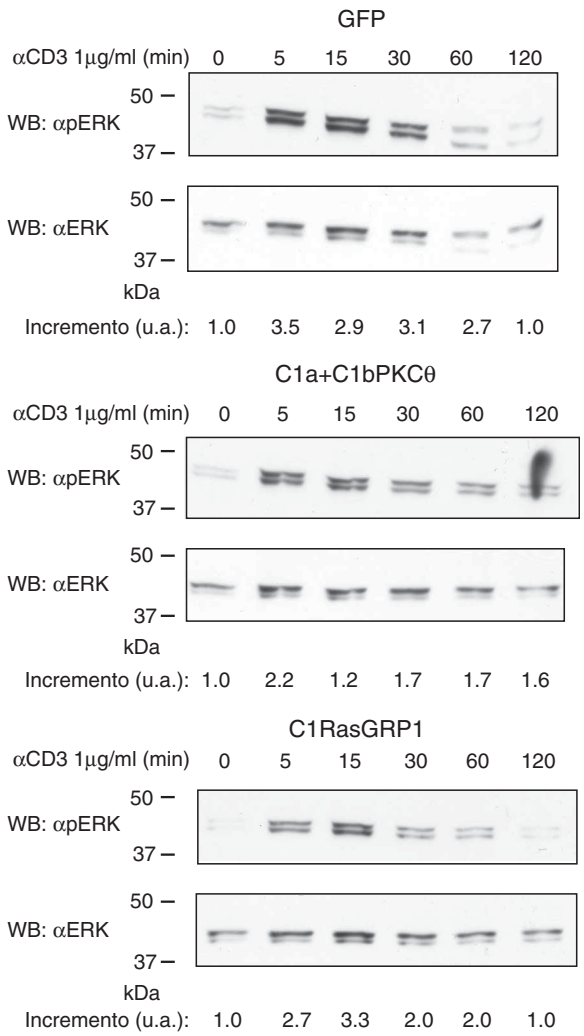


Figura R21 – Análisis de la activación de Ras en respuesta a la estimulación con αCD3 soluble en células Jurkat que expresan C1a+C1bPKCθ o C1RasGRP1.
Se transfectaron células Jurkat con GFP, GFPC1a+C1bPKCθ o C1RasGRP1 y 24 h después se aislaron las células positivas para GFP que se mantuvieron en cultivo 8 h. Pasado este tiempo las células GFP y GFPC1RasGRP1 positivas eran un 95% de la población mientras que las positivas para GFPC1a+C1bPKCθ eran un 78%. Se retiró el suero del medio y las células se mantuvieron en estas condiciones 1 h. Se recogieron y resuspendieron en HBSS para estimular con αCD3 soluble (1 μg/ml) durante los tiempos indicados y entonces recoger las muestras y procesarlas para su lisis. Los extractos celulares fueron resueltos por electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras y se analizaron por WB con un anticuerpo específico contra pERK. Como control de carga se usó sobre las mismas membranas un anticuerpo contra ERK. El incremento, expresado en unidades arbitrarias (u.a.), se calculó a partir de un análisis densitométrico de las autoradiografías. Los valores expresados se normalizaron considerando los niveles de proteína total en cada muestra.

MECANISMOS DE TRANSLOCACIÓN Y ACTIVACIÓN DE RASGRP1

Como hemos demostrado la presencia de U73122 o de los dominios C1a+C1bPKCθ o C1RasGRP1 alteran la activación de Ras y sus efectores en las células Jurkat. Estos datos demuestran la importancia del DAG en la activación de los linfocitos y apuntan a la familia de RasGRP como la encargada de mediar este efecto y más concretamente, a RasGRP1 que es la isoforma que se expresa en células T. Esta proteína, como ya hemos explicado, contiene en su estructura primaria un dominio C1 que le permite responder al DAG. Sin embargo, el comportamiento de este C1 aislado y de la proteína completa es muy diferente en términos de translocación en respuesta a la activación del TCR (FigR18) y es por esto que decidimos estudiar cuál es el papel que juega este dominio C1 y el DAG en la función de RasGRP1.

1 PAPEL DEL DAG Y DEL DOMINIO C1 DE RASGRP1 EN SU ACTIVACIÓN Y TRANSLOCACIÓN

A) Translocación de RasGRP1 en respuesta a ésteres de forbol.

Se ha descrito con anterioridad que el dominio C1 de RasGRP1 es esencial para la capacidad transformante de la proteína en ensayos de focos[114,479] y que es capaz de responder en ensayos in vitro a ésteres de forbol tipo PDBu[294,401,458]. Comprobamos por lo tanto la capacidad de la proteína completa para responder a PMA o PDBu en células Jurkat transfectadas con RasGRP1 fusionada a GFP (GFPRasGRP1) (vídeos suplementarios 18 y 19 y FigR22). En respuesta a PMA, GFPRasGRP1 aumenta su localización de partida en membrana plasmática para pasados 2 minutos redistribuirse también en estructuras perinucleares. En el caso del PDBu detectamos en paralelo movimiento a membranas plasmática e internas ya que este compuesto es capaz de introducirse en la célula con mayor facilidad que el PMA[351].

RasGRP1 es capaz de responder a ésteres de forbol al igual que su C1 aislado.

B) Estudio del mutante de RasGRP1 incapaz de unir DAG.

Sabemos por lo datos del dominio C1b de PKCθ que en la zona de contacto con la microesfera recubierta de αCD3 y αCD28 se produce un aumento de DAG (FigR18). Aunque el C1 de RasGRP1 no sea capaz de detectar este aumento cuando se expresa de forma aislada en la célula (FigR18), desconocíamos si colaboraría en el movimiento de la proteína completa a esta localización. Para estudiar esta posibilidad generamos un mutante que es incapaz de unir ésteres de forbol y por analogía DAG, al presentar un cambio en uno de los residuos que colabora en el correc-

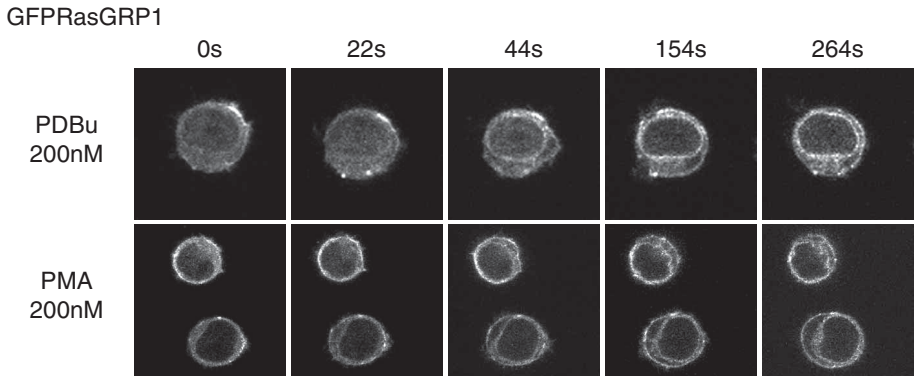


Figura R22 – Respuesta de RasGRP1 a ésteres de forbol.
Las células Jurkat fueron transfectadas con GFPRasGRP1. Tras 24h en cultivo se recogieron las células necesarias y se resuspendieron en HBSS para depositarlas sobre cámaras de microscopía recubiertas con poli-D,L-lisina. Estas cámaras se montaron sobre la placa a 37ºC en el microscopio confocal y se procedió al análisis. Tras la captura de la primera imagen del vídeo (t=0s) se añadieron PMA o PDBu a una concentración final de 200nM y se fueron tomando imágenes cada 11s. Las imágenes a los tiempos indicados muestran la translocación de GFPRasGRP1. Los vídeos suplementarios 18 y 19 contienen todas las imágenes del periodo de estimulación.

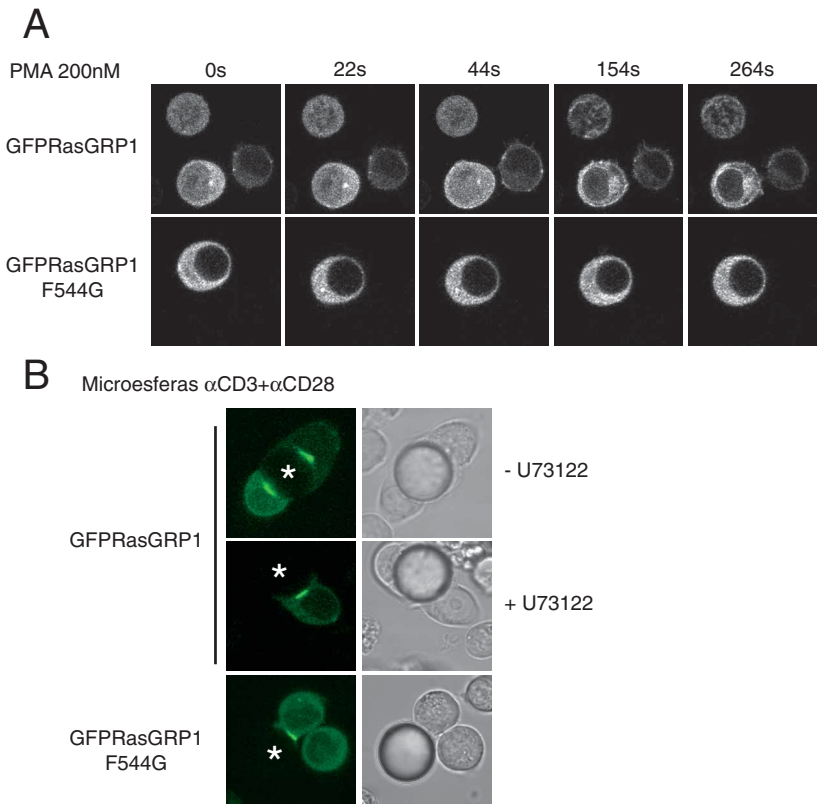


Figura R23 – Respuesta de GFPRasGRP1 y su mutante GFPRasGRP1F544G a PMA y a microesferas recubiertas de αCD3+αCD28. Las células Jurkat fueron transfectadas con GFPRasGRP1 o su mutante GFPRasGRP1F544G.

A- Las células transfectadas se trataron como se indica en la figura R22 para analizar su respuesta a PMA. Las imágenes a los tiempos indicados muestran las diferencias de translocación entre las dos construcciones. Los vídeos suplementarios 20 y 21 contienen todas las imágenes del período de estimulación.

B- 24h después de la transfección las células se recogieron y se incubaron con U73122 (1μM) o no (-/+U73122) durante 30min. Se resuspendieron en HBSS, manteniendo la concentración de inhibidor, en los casos requeridos, durante todo el ensayo. Las células se mezclaron con microesferas recubiertas con αCD3 y αCD28 en una relación célula:microesfera 1:1. Se mantuvieron 15min a 37ºC y posteriormente se depositaron sobre las cámaras de microscopía tratadas con poli-D,L-lisina. Estas cámaras se llevaron al microscopio confocal y se mantuvieron a 37º C. Se indica con un asterisco la posición de la microesfera. Las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

to plegamiento del dominio (F544G)[242]. Este mutante no responde a la adición de PMA (vídeos suplementarios 20 y 21 y FigR23A) pero sin embargo sí transloca a la zona de contacto con la microesfera al igual que la proteína silvestre (FigR23B). De acuerdo con estos resultados, GFPRasGRP1 transloca a la zona de contacto con la microesfera cuando las células han sido preincubadas con U73122 (FigR23B).

La translocación de la proteína RasGRP1 completa a la zona de contacto con la microesfera no requiere un dominio C1 funcional ni actividad PLC.

C) Importancia del DAG en la activación de RasGRP1

A pesar de que la translocación de RasGRP1 no sea dependiente de incrementos de DAG la función de la proteína sí parece afectarse en presencia de U73122 (FigR20). Para comprobar la relevancia del DAG y Ca^{2+} en la activación de GFPRasGRP1 analizamos la cinética de carga de Ras con GTP en respuesta a αCD3 y αCD28 en células preincubadas o no con U73122. Las células control, transfectadas con GFP, muestran la cinética característica con un máximo de carga a 5 minutos que se bloquea en presencia de U73122 (FigR24). Cuando se sobreexpresa RasGRP1 se observa un aumento de Ras-GTP en situación basal y la cinética de activación es más sostenida. Sin

embargo cuando las células han sido preincubadas con U73122 no hay activación en respuesta a estímulo y se mantiene la carga basal que sigue siendo superior a la de las células control.

La sobreexpresión de RasGRP1 permite la activación de Ras. En respuesta al estímulo, a esta activación de partida se suma el efecto del Ca^{2+} y el DAG generados por PLC, permitiendo una mayor activación que se bloquea en presencia de U73122.

2 ESTIMULACIÓN CON CÉLULAS PRESENTADORAS

Nuestros datos parecían indicar que aunque el DAG era necesario para la activación de RasGRP1, no estaba implicado en la translocación de la proteína a la membrana. Para estudiar con más detalle cuáles eran entonces los factores encargados de la translocación de RasGRP1, el uso de las microesferas recubiertas de anticuerpos suponía un problema. En estas condiciones la estimulación sólo se producía a nivel del CD3 y CD28 y no participaban otras muchas proteínas que están implicadas en el contacto durante la activación del linfocito T[142].

Para intentar solventar este aspecto pusimos a punto en el laboratorio un sistema de activación con células presentadoras de antígeno: EBV-221 que se cargan con un superantígeno, en nuestro caso, SEE, para proceder a la estimulación. Comprobamos que en presencia de células presentadoras cargadas se producía la activación de ERK al aumentar su fosforilación en la célula activada, fundamentalmente en la zona de contacto (FigR25A). Además se detectó un claro aumento en el número de células que orientan su aparato de Golgi hacia la célula presentadora[101] (FigR25A). En términos de translocación usamos como control el movimiento de GFPPKCθ[103] (FigR25B) que se desplaza a la zona de contacto en presencia de superantígeno.

A) Translocación de RasGRP1

Cuando analizamos en estas mismas condiciones GFPRasGRP1, la proteína se encontraba concentrada en las proximidades de la célula presentadora, aunque ésta no estuviese cargada con el superantígeno (FigR26).

RasGRP1 se distribuye en la zona de contacto con la célula presentadora en ausencia de SEE.

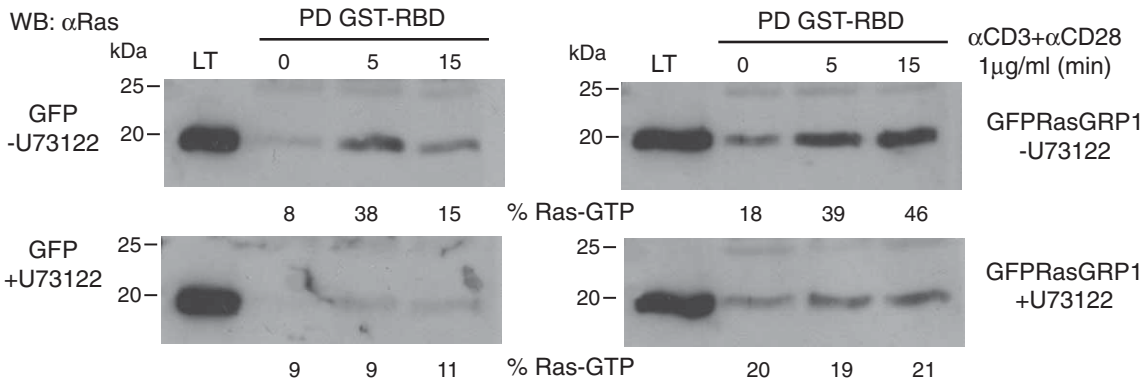


Figura R24 – Efecto de la adición de U73122 y/o la sobreexpresión de RasGRP1 sobre la carga con GTP de Ras en respuesta a la estimulación del TCR.
Se transfectaron células Jurkat con GFP o GFPRasGRP1 y se cultivaron 24h. Se retiró el suero del medio y se mantuvieron en estas condiciones 1h. A la mitad de las células de cada transfección se le añadió durante los últimos 20min U73122 (1μM) y se mantuvieron en presencia del inhibidor todo el ensayo. Se recogieron las células y se resuspendieron en HBSS (-/+ U73122) para proceder a la estimulación con αCD3+αCD28 (1 μg/ml cada uno) los tiempos indicados. Una vez recogidos todas las muestras las células se lisaron y los extractos obtenidos se cuantificaron para separar alícuotas para el control del lisado total (LT) o para incubar con GST-RBD (PD) y detectar los niveles de Ras-GTP (ver materiales y métodos). Todas las muestras se resolvieron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y se analizaron por WB con un anticuerpo específico contra Ras. Las autoradiografías se usaron para realizar un análisis densitométrico de las bandas de interés. Se expresa el nivel de carga con GTP en porcentaje respecto a la cantidad de Ras en el LT. Se comprobó el nivel de expresión de cada una de las construcciones por citometría de flujo, los porcentajes fueron 57% en el caso de GFP y 12% para GFPRasGRP1.

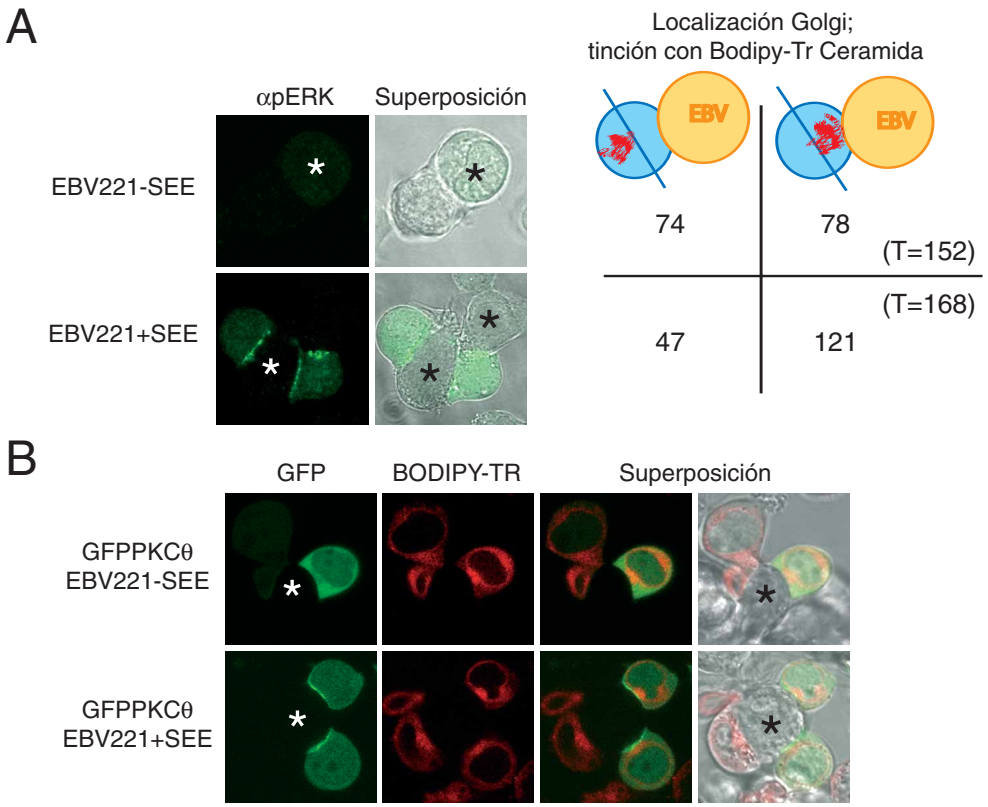


Figura R25 – Estimulación de células Jurkat con células presentadoras de antígeno.

A- Las células Jurkat se incubaron durante 15min con las células presentadoras EBV-221 previamente cargadas o no con SEE (-/+ SEE) en una proporción Jurkat:EBV221 1:1. Se depositaron sobre cubreobjetos tratados con poli-D,L-lisina y una vez pegadas se fijaron con PFA2% durante 8min para llevar a cabo la tinción con αpERK tal como se indica en materiales y métodos. En el esquema de la derecha se muestra el número de células Jurkat que presentan una determinada ubicación del Golgi en función de que la célula presentadora con la que interaccionan esté cargada o no con SEE. La línea azul representa la línea imaginaria que trazamos sobre cada célula para determinar si el Golgi (en rojo) se sitúa hacia la zona de contacto o al contrario (T, número total de células analizadas en cada condición).

B- Las células Jurkat se transfectaron con GFPPKCθ. Después de 24h se incubaron con Bodipy-TR-ceramida para marcar el aparato de Golgi (ver materiales y métodos). Se recogieron las células necesarias para centrifugarlas y resuspenderlas en HBSS junto con las células EBV-221 cargadas o no (-/+ SEE) en una proporción Jurkat:EBV221 1:1. Tras 15min a 37ºC se pasaron a cámaras de microscopía tratadas con poli-D,L-lisina para poder observar las muestras por microscopía confocal manteniendo la temperatura a 37ºC. En verde se muestra la localización de la proteína, en rojo el aparato de Golgi y los dos paneles de la derecha corresponden con la superposición de ambos colores sólos, o sobre la imagen de contraste de fase. El asterisco indica la posición de la célula presentadora. Todas las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

La translocación en ausencia de superantígeno parecía indicar que el movimiento de RasGRP1 era independiente de señalización y de hecho la adición de varios inhibidores clásicos que bloquean la señalización del TCR: PP2 que bloquea el primer paso de fosforilación por Src quinasas[306] y U73122 que inhibe la actividad PLC[424], no altera la localización de la proteína en respuesta a la célula presentadora de antígeno esté o no cargada con SEE (datos no mostrados y FigR27). Comprobamos también el efecto de la Bisindolilmaleimida[485] (Bim) a bajas y altas concentraciones ya que se ha postulado un posible mecanismo de regulación de RasGRP1 mediado por fosforilación vía PKCs[554] (FigR27). No detectamos ningún cambio respecto a las células control.

La translocación de RasGRP1 no se altera en presencia de inhibidores que anulan la señalización del TCR como PP2 y U73122.

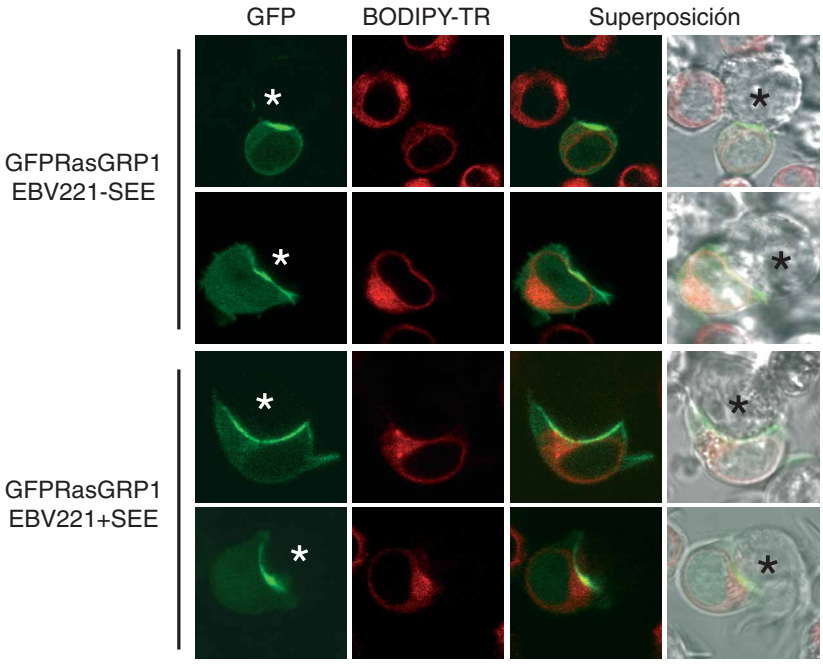


Figura R26 – Translocación de GFPRasGRP1 en respuesta a células presentadoras EBV-221.
Las células Jurkat se transfectaron con GFPRasGRP1. Después de 24h en cultivo se procesaron como se indica en la figura R25B. En verde se muestra la localización de GFPRasGRP1, en rojo el aparato de Golgi y los paneles de la derecha corresponden con la superposición de ambos colores sólos, o sobre la imagen de contraste de fase. El asterisco indica la posición de la célula presentadora. Todas las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

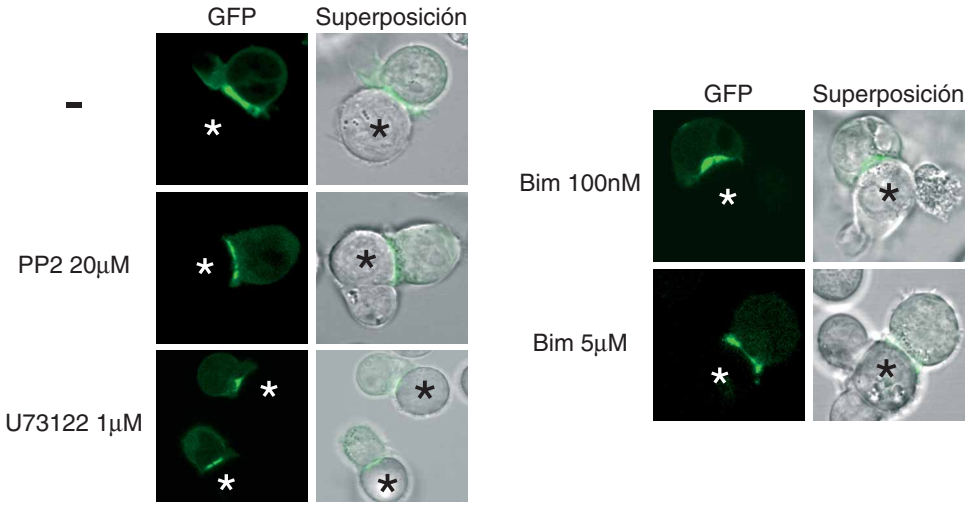


Figura R27 – Efecto de los inhibidores PP2, U73122 y Bisindolilmaleimida en la translocación de RasGRP1 en presencia de la célula presentadora cargada con SEE.
Se transfectaron células Jurkat con GFPRasGRP1. Tras 24h en cultivo las células necesarias se recogieron y resuspendieron en HBSS con PP2 20µM, U73122 1µM o Bisindolilmaleimida (Bim) 100nM o 5µM. Después de 30min de preincubación con los inhibidores se incorporaron las células presentadoras cargadas con SEE en una relación Jurkat:EBV-221 1:1 manteniendo en todo momento la concentración indicada de cada inhibidor. Se dejaron 15min a 37ºC y posteriormente se pasaron a las cámaras de microscopía para llevar a cabo el análisis in vivo en el microcopio confocal. En verde se muestra la localización de GFPRasGRP1. El asterisco indica la posición de la célula presentadora. Todas las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

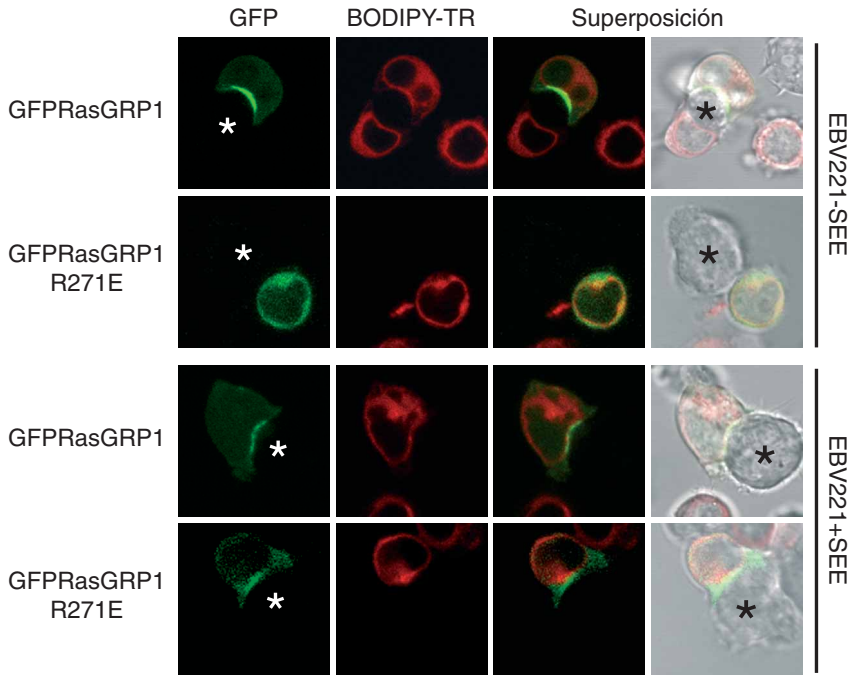


Figura R28 – Translocación del mutante GFPRasGRP1R271E en presencia de la célula presentadora.
Se transfectaron células Jurkat con GFPRasGRP1 o su mutante GFPRasGRP1R271E. Se procesaron y analizaron como se indica en la figura R25B. En verde se muestra la localización de la proteína indicada, en rojo el aparato de Golgi y en los dos paneles de la derecha la superposición de ambos colores sólos, o sobre la imagen de contraste de fase. El asterisco indica la posición de la célula presentadora. Todas las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

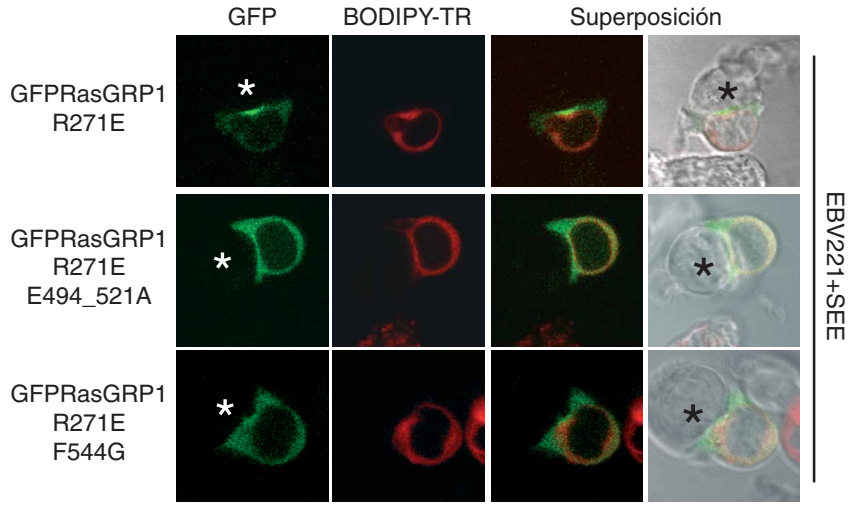


Figura R29 – Translocación de los mutantes GFPRasGRP1R271E, R271E_E494_521A o R271E_F544G en presencia de la célula presentadora.
Se transfectaron células Jurkat con GFPRasGRP1R271E, R271E_E494_521A o R271E_F544G. Se procesaron y analizaron como se indica en la figura R25B. En verde se muestra la localización de la proteína indicada, en rojo el aparato de Golgi y en los dos paneles de la derecha la superposición de ambos colores sólos, o sobre la imagen de contraste de fase. El asterisco indica la posición de la célula presentadora. Todas las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

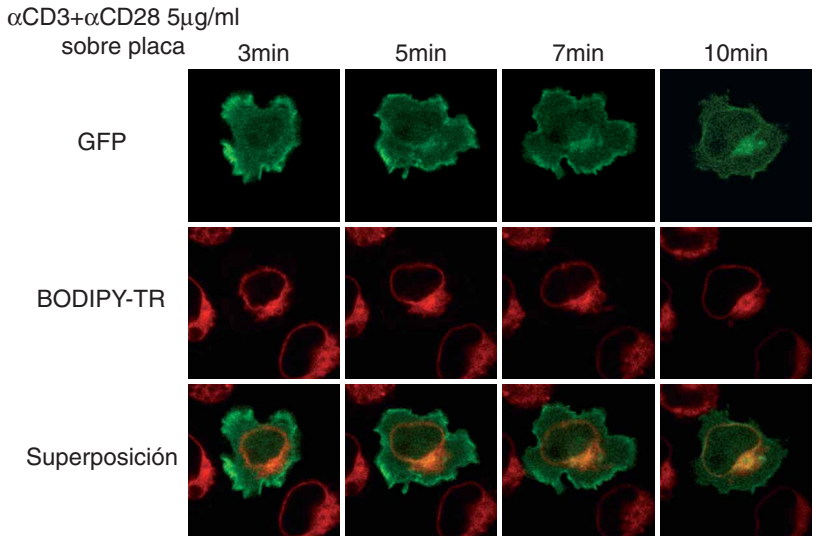


Figura R30 – Translocación de GFPRasGRP1 en respuesta a anticuerpos sobre placa.
Se transfectaron células Jurkat con GFPRasGRP1 y se mantuvieron en cultivo 24h. Pasado este tiempo las células se incubaron en presencia de Bodipy-Tr-ceramida para poder marcar el Golgi (ver materiales y métodos). Se prepararon cámaras de microscopía recubiertas con anticuerpos αCD3+αCD28 como se indica en materiales y métodos. Estas cámaras se montaron en el microscopio confocal manteniendo la temperatura a 37ºC. Se añadieron las células en HBSS sobre las cámaras considerando este punto como tiempo 0. En el momento que se detectaron células pegándose a la superficie se seleccionó un campo y se capturaron imágenes cada 20s. Las imágenes a los tiempos indicados muestran la translocación de GFPRasGRP1. El vídeo suplementario 22 contiene todas las imágenes del periodo de estimulación. En verde se muestra la localización de RasGRP1, en rojo el aparato de Golgi y en el panel inferior la superposición de ambos colores.

B) Estudio del papel de Ras en la translocación.

El movimiento de RasGRP1 en ausencia de señal no se debía a un simple contacto célula-célula ya que sólo se producía en el caso de la célula presentadora. Pensamos por lo tanto que el movimiento de RasGRP1 respondía a una reorganización de los componentes de membrana al reconocer en la célula presentadora elementos característicos de ésta como MHC, CD80, CD86 o moléculas de adhesión tipo ICAM-1 o LFA-3[507]. Elementos como CD4, asociado a las balsas lipídicas o rafts[140], o CD3 son algunos de estos componentes que se desplazan y reorganizan en estas condiciones[143,386].

En las primeras descripciones de RasGRP1[479] se postuló su posible miristoilización en la glicina en posición 2 lo que podría asociar a RasGRP1 con la membrana plasmática. El análisis de los residuos contiguos demuestra que no cumplen los requisitos para que tenga lugar esta modificación.

H-Ras, N-Ras y K-Ras, algunos de los efectores establecidos para RasGRP1[479], se modifican postraduccionalmente de tal forma que permanecen asociados con las membranas[171]. Dada la localización parcial de RasGRP1 a membrana plasmática y su reclutamiento a la zona de contacto con la célula presentadora en ausencia de señal nos planteamos si este efecto podría deberse a una asociación con Ras. Generamos un mutante de RasGRP1 incapaz de unir Ras[40,367,479] RasGRP1R271E (FigI6) y estudiamos su localización. Este mutante a diferencia de la proteína silvestre es totalmente citosólico y sólo transloca cuando la célula presentadora está cargada con SEE (FigR28).

La unión a Ras de RasGRP1 puede explicar su localización parcial a membrana en ausencia de estímulo y su reclutamiento a la zona de contacto con la célula presentadora sin SEE.

C) Estudio de los dominios de unión a DAG y Ca^{2+}.

Para analizar qué otros factores podrían participar en la translocación en presencia de la célula presentadora usamos el mutante incapaz de unir DAG (F544G) y generamos una serie de mutantes que anulaban la funcionalidad de cada uno de las manos de Ca^{2+} (E494A y E521A) o de

ambos a la vez (E494_521A) (FigI6). Ninguna de estas construcciones mostraba cambios en localización en comparación con la proteína silvestre (datos no mostrados). Sin embargo, ni el doble mutante incapaz de unir Ras y DAG (R271E_F544G) ni el triple mutante que no une Ras y tampoco Ca^{2+} (R271E_E494_521A) translocaban cuando la célula presentadora estaba cargada con SEE (FigR29).

En el mutante de RasGRP1 incapaz de unir Ras, los dominios de unión a DAG y Ca^{2+} son necesarios para la correcta ubicación de la proteína en la zona de contacto con la célula presentadora.

3 ESTIMULACIÓN CON ANTICUERPOS SOBRE PLACA

A pesar de que se ha descrito con anterioridad la translocación de RasGRP1 a Golgi en respuesta a la estimulación con anticuerpos αCD3 solubles[40,369] en nuestro laboratorio no se ha podido observar dicho movimiento, en células vivas, ya sea activando con anticuerpos solubles, sobre una microesfera o con las células presentadoras. Sin embargo, cuando se usan anticuerpos αCD3 y αCD28 recubriendo una placa se puede detectar un cambio de localización de la proteína que inicialmente se asocia con el contorno celular y posteriormente con estructuras internas que colocalizan con el marcador de Golgi, Bodipy-Tr-Ceramida (vídeo suplementario 22 y FigR30). Para poder establecer con precisión los tiempos a los que la proteína se desplaza en el interior celular se fijaron las células antes de la estimulación y a 5, 15, 30 y 60 minutos tras ser depositadas sobre la placa recubierta con los anticuerpos (FigR31). A 5 minutos se observa una acumulación de la proteína en un anillo exterior para a tiempos posteriores colocalizar con el marcador de Golgi, Bodipy-Tr-ceramida en el interior celular e ir acumulándose hasta alcanzar un máximo a 60 minutos cuando prácticamente no se detecta proteína en el exterior.

En respuesta a la estimulación con anticuerpos pegados a placa, RasGRP1 transloca a tiempos cortos a la membrana plasmática y posteriormente a Golgi.

A) Producción de DAG en respuesta al estímulo. Papel del dominio C1 de RasGRP1 en la translocación.

Usamos como sensor de producción de DAG el dominio C1 de PKCθ para comparar entre la estimulación con las células presentadoras y con anticuerpos pegados sobre placa. En este último caso detectamos una elevada producción en la membrana cuando la célula se está pegando a la superficie para rápidamente acumularse prácticamente en su totalidad en estructuras internas

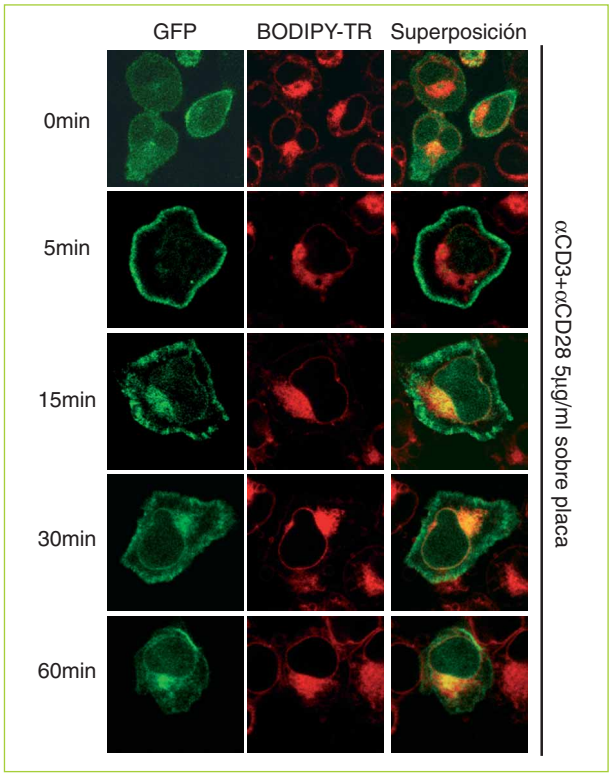


Figura R31 – Translocación de GFPRasGRP1 en respuesta a anticuerpos sobre placa en células fijadas.
Se transfectaron células Jurkat con GFPRasGRP1 y se mantuvieron en cultivo 24h. Pasado este tiempo las células se incubaron en presencia de Bodipy-Tr-ceramida para poder marcar el Golgi (ver materiales y métodos). Se trataron cubreobjetos con una mezcla de αCD3+αCD28 (5, 15, 30 o 60min) o con poli-D,L-lisina (0min) para depositar las células sobre ellos y fijar con PFA2% a los tiempos indicados. Tras varios lavados las células se montaron para su posterior análisis en el microscopio confocal. En verde se muestra la localización de RasGRP1, en rojo el aparato de Golgi y en el panel de la derecha la superposición de los dos colores. Todas las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

(FigR32A). Sin embargo, con las células presentadoras se puede detectar DAG en membrana plasmática de una forma constante y mantenida en el tiempo. En alguna de las células observadas, se detecta una señal en las membranas internas durante todo el proceso de estimulación pero no se aprecia un incremento como cuando se estimula sobre placa; esta señal es similar a la de las células en situación basal por lo que probablemente se corresponda con un DAG no dependiente de señalización (FigR32B).

Al observar los altos niveles de DAG asociados a Golgi en la estimulación sobre placa se consideró la posibilidad de que RasGRP1 estuviese asociada a estas estructuras a través de su dominio C1 que une el DAG. Al tratar las células con U73122 en estas condiciones

RasGRP1 perdía su localización interna, indicando la necesidad del DAG para su mantenimiento en esta posición (FigR33A). Al analizar la localización del mutante del dominio C1 incapaz de unir ésteres de forbol (GFPRasGRP1F544G) sólo se detecta proteína asociada a la membrana plasmática (FigR33B).

En las células estimuladas con anticuerpos sobre placa la localización en Golgi de RasGRP1 es dependiente de la producción de DAG y de su dominio C1.

B) Papel de la unión a Ras en la translocación

En comparación con la localización a Golgi, la de membrana plasmática no se alteraba por la adición de U73122 o el uso del mutante del dominio C1 indicando una vez más la implicación de otros elementos, como la unión a Ras, en este proceso. En este sentido se comprobó que el mutante incapaz de unir Ras (GFPRasGRP1R271E) no es capaz de translocar a membrana plasmática ni tampoco a Golgi (FigR34). Esto indica que Ras también juega un papel en la localización a membranas internas bien por la presencia en estas posiciones de Ras[171] o bien porque es necesario el paso por membrana plasmática para algún tipo de modificación postraduccional que disponga al C1 para reconocer el DAG.

La translocación de RasGRP1 en respuesta a la estimulación con anticuerpos pegados a placa es dependiente de la interacción con Ras.

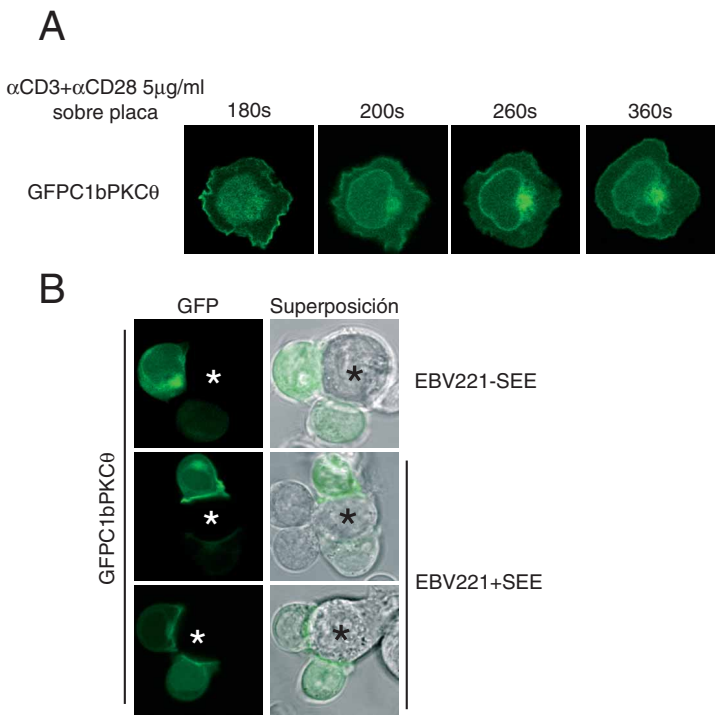


Figura R32 – Producción de DAG en respuesta a anticuerpos pegados a placa o células presentadoras.
Se transfectaron células Jurkat con GFPC1bPKCθ y se mantuvieron en cultivo 24h.

A - Se prepararon cámaras tratadas con αCD3+αCD28 y se montaron en el microscopio confocal manteniendo la temperatura a 37ºC. Se añadieron las células en HBSS sobre las cámaras considerando este punto como tiempo 0. En el momento que se detectaron células pegándose a la superficie se seleccionó un campo y se capturaron imágenes cada 20s. Las imágenes a los tiempos indicados muestran la translocación de GFPC1bPKCθ.

B - Se recogieron las células y se resuspendieron en HBSS con células EBV-221 cargadas o no (-/+ SEE) en una proporción Jurkat:EBV-221 1:1. Esta mezcla se depositó sobre cámaras de microscopía recubiertas con poli-D,L-lisina y se analizó la localización de GFPC1bPKCθ (en verde) en el microscopio confocal manteniendo la temperatura a 37ºC. El asterisco indica la posición de la célula presentadora. Las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados.

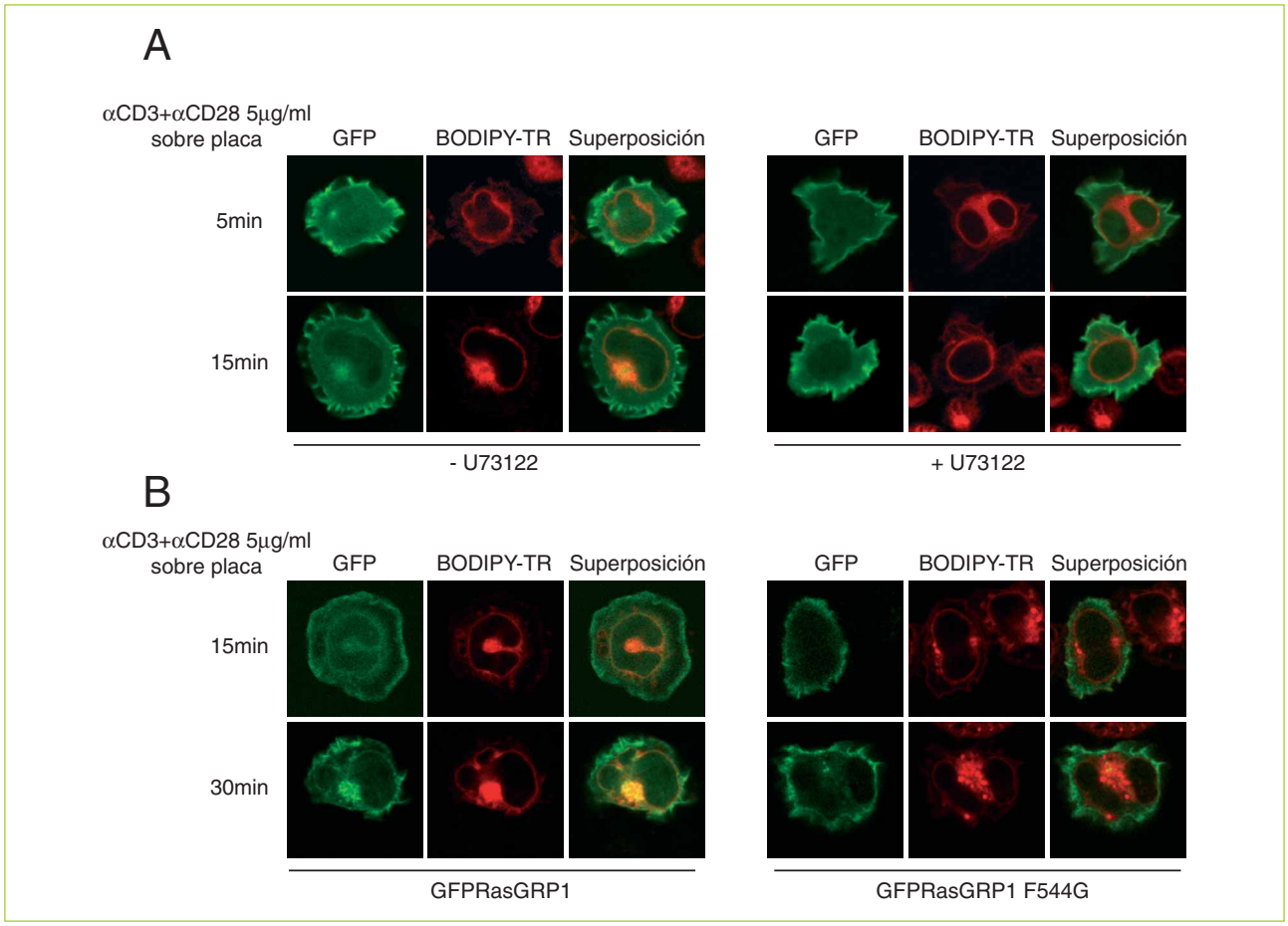


Figura R33 – Efecto de U73122 en la translocación de GFPRasGRP1 en respuesta a anticuerpos pegados a placa. Translocación del mutante GFPRasGRP1F544G.

A - Se transfectaron células Jurkat con GFPRasGRP1 y tras 24h en cultivo se incubaron con Bodipy-Tr-ceramida para marcar el Golgi (ver materiales y métodos). Se recogieron y resuspendieron en HBSS -/+ U73122 (1µM) durante 20 minutos y se depositaron sobre cámaras recubiertas de αCD3+αCD28 montadas en el microscopio confocal a 37ºC, considerando este momento como tiempo 0.

B - Se transfectaron células Jurkat con GFPRasGRP1 o su mutante GFPRasGRP1F544G y se mantuvieron en cultivo 24h. Las células se incubaron con Bodipy-Tr-ceramida y una vez marcado el Golgi se resuspendieron en HBSS para depositarlas sobre unos cristales tratados con αCD3+αCD28 y fijar con PFA2% a los tiempos indicados. Las muestras se montaron para su posterior observación en el microscopio confocal. Las imágenes en verde muestran la localización de la proteína de interés a los tiempos indicados; el aparato de Golgi en rojo y en el panel de la derecha de cada bloque la superposición de los dos colores. Las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados.

4 BÚSQUEDA DE OTROS MECANISMOS QUE COLABOREN EN LA TRANSLOCACIÓN DE RASGRP1 A MEMBRANA PLASMÁTICA

Para intentar explicar cómo se producía la translocación de RasGRP1 a la membrana plasmática y si hay más elementos implicados además de Ras, analizamos su secuencia primaria en busca de residuos o dominios que pudiesen explicar este movimiento. En este sentido RasGRP1 tiene una serie de prolinas entre el dominio GEF y las manos de Ca^{2+} (FigI6) que podrían estar implicadas en la unión a dominios SH3 (FigR35A) y más concretamente, según la predicción del programa SCAN MOTIF (http://scansite.mit.edu/)[533], al dominio SH3 de p85, subunidad reguladora de PI3K. p85 localiza en la sinapsis inmunológica por interacción con adaptadores como Crk[150] o con la propia porción intracelular de CD28[488], atrayendo así a la subunidad catalítica, p110, y permitiendo el aumento de fosfatidilinositoles fosforilados en su posición 3, característico de la señal del TCR[88]. Además en células B, p85 controla determinadas señales reguladas por DAG[180], por lo que no se puede descartar esta posibilidad en células T.

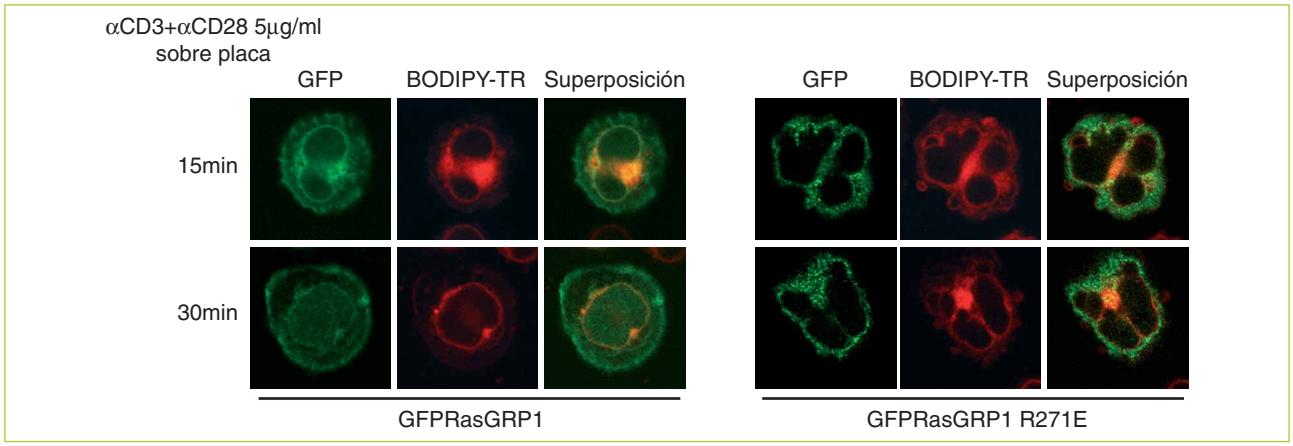


Figura R34 – Translocación del mutante GFPRasGRP1 o GFPRasGRP1R271E en respuesta a anticuerpos pegados a placa. Se transfectaron células Jurkat con GFPRasGRP1 o su mutante GFPRasGRP1R271E y se mantuvieron 24h en cultivo. Las células se procesaron como en la figura R33B para su posterior observación en el microscopio confocal. Las imágenes en verde muestran la localización de la proteína de interés a los tiempos indicados; el aparato de Golgi en rojo y en el panel de la derecha de cada bloque la superposición de los dos colores. Las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados.

A) Estudio de la interacción de RasGRP1 con p85 en células Hek293.

Teniendo en cuenta estos antecedentes p85 podía ser un buen candidato para explicar la translocación de RasGRP1. Para comprobar esta posible interacción entre las dos proteínas se transfectaron células HEK293 con RasGRP1. Usando anticuerpos específicos contra p85 se inmunoprecipitó la proteína endógena y se detectó RasGRP1 asociado a este inmunoprecipitado (FigR35B). En estas mismas condiciones se transfectaron además de RasGRP1 dos mutantes truncados de p85: p50[145] y SH3_BCR[223]. El mutante p50, fusionado al epítopo FLAG, corresponde con la porción carboxi terminal de p85 y por lo tanto no contiene el dominio SH3, al contrario que el mutante SH3_BCR que comprende los residuos del 6 al 372 e incluye este dominio; en este caso la construcción está fusionada a HA. Se inmunoprecipitaron las dos construcciones de p85 usando anticuerpos contra FLAG o HA. Sobre estos inmunoprecipitados se analizó la presencia de RasGRP1 y sólo se detectó en el caso de la construcción que porta el dominio SH3 (FigR35C).

La porción amino terminal de p85, que contiene el dominio SH3, está implicada en la interacción con RasGRP1.

B) Estudio de la interacción entre RasGRP1 y p85 en células Jurkat en condiciones de estimulación.

Para determinar si esta interacción también se producía en nuestro sistema modelo, las células Jurkat, y si era modulada por la activación del TCR se transfectaron células Jurkat con GFPRasGRP1 o GFP, como control. Se aislaron las células positivas para GFP y se estimularon con αCD3 y αCD28 soluble durante 10 minutos. Usando un anticuerpo contra GFP se inmunoprecipitó la proteína de fusión o bien sólo GFP. Únicamente, se detectó la presencia de p85 endógeno en el inmunoprecipitado de GFPRasGRP1 y en ausencia de estímulo (t=0) (FigR35D). Esto indica que la interacción entre RasGRP1 y p85 se produce antes de que p85 esté formando parte del complejo de señalización del TCR. En respuesta a la activación, p85 se asocia con PLCγ en este complejo (datos no mostrados). La ausencia de PLCγ en el inmunoprecipitado con GFP confirma que RasGRP1 se separa de p85 antes de que éste localice en membrana junto con PLCγ.

Estos resultados pueden explicar el movimiento de RasGRP1 de citosol a membrana dirigido por la interacción con p85 pero no, cómo se mantiene la proteína en esta localización después de perder la asociación.

C) Estudio de la interacción de RasGRP1 con el dominio SH3 de p85 por doble híbrido.

En paralelo a estos experimentos se clonaron tanto la proteína RasGRP1 como el dominio SH3 de p85 en vectores de doble híbrido. Esto nos permitía, en primer lugar, comprobar si la interacción que detectábamos se producía en las levaduras y por lo tanto, era una unión directa entre estas dos proteínas, y en segundo, llevar a

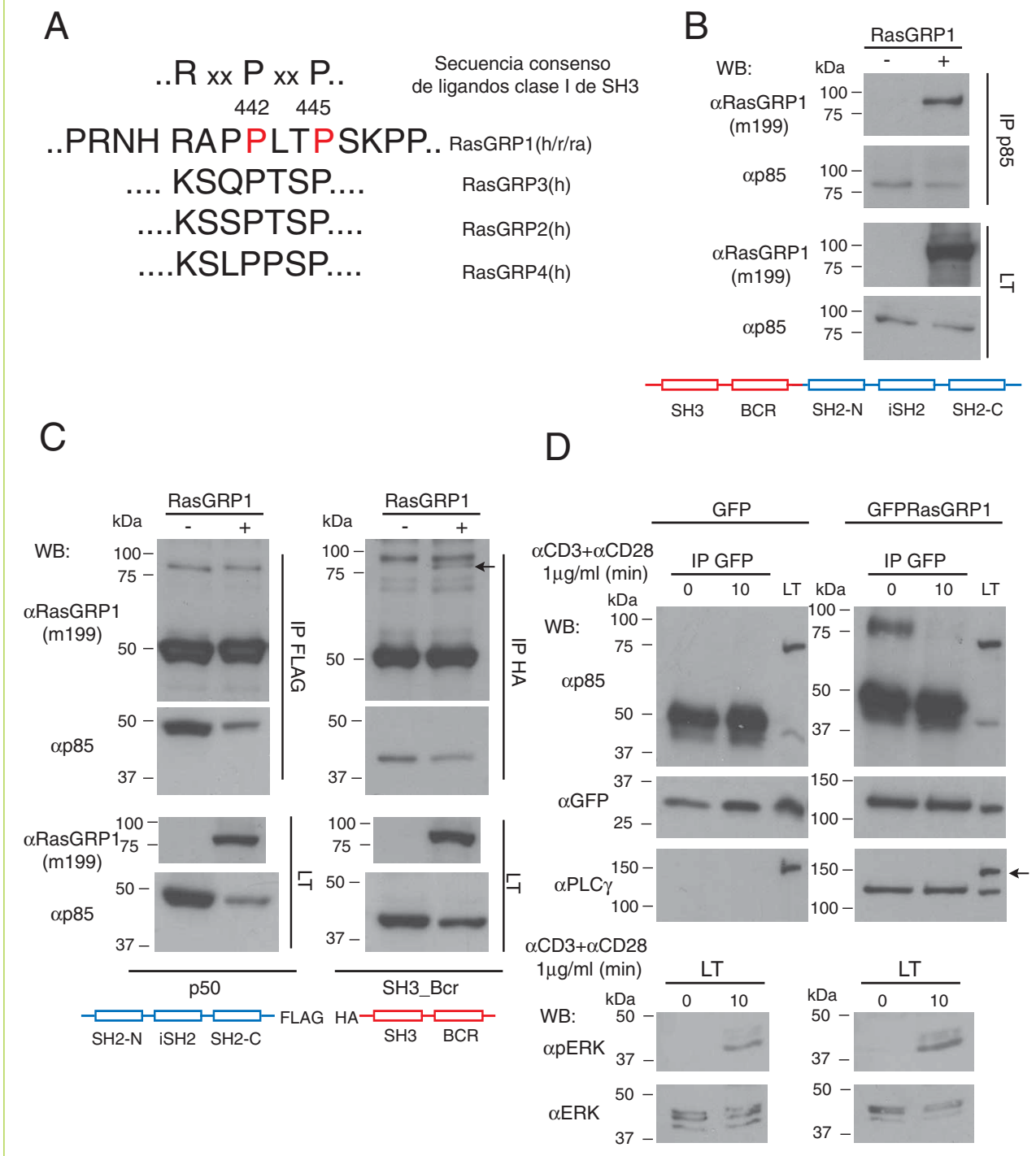

A
..R xx P xx P..
442 445
Secuencia consenso de ligandos clase I de SH3
..PRNH RAPPLTPSKPP.. RasGRP1(h/r/ra)
.... KSQPTSP.... RasGRP3(h)
....KSSPTSP.... RasGRP2(h)
....KSLPPSP.... RasGRP4(h)
B
RasGRP1
WB:
kDa
-
+
αRasGRP1 (m199)
αp85
IP p85
LT
SH3
BCR
SH2-N
iSH2
SH2-C
C
RasGRP1
WB:
αRasGRP1 (m199)
αp85
IP FLAG
IP HA
LT
p50
SH3_Bcr
FLAG
HA
SH2-N
iSH2
SH2-C
SH3
BCR
D
GFP
GFPRasGRP1
αCD3+αCD28 1μg/ml (min)
IP GFP
0
10
LT
WB:
αp85
αGFP
αPLCγ
αpERK
αERK

Figura R35 *(página anterior)* **– Interacción de RasGRP1 y p85.**

A - Alineamiento de los 4 miembros de la familia de RasGRP de distintas especies (h, humano, r, ratón, ra, rata) y la secuencia consenso de ligandos clase I de SH3. x, cualquier aminoácido, P, prolinas de RasGRP1 implicadas en la unión; se indica su posición en la secuencia primaria de rata.

B - Se transfectaron o no células HEK293 con RasGRP1 (-/+) y se mantuvieron 24h en cultivo. Tras la recogida y lisis de las células se cuantificó la cantidad de proteína para separar unas alícuotas control para los lisados totales (LT) y otras para proceder a la inmunoprecipitación (IP) durante 12-16h con un anticuerpo específico contra p85. Tanto los inmunoprecipitados como los controles se resolvieron pos electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras y las proteínas de interés se detectaron por WB con anticuerpos específicos.

C - Se transfectaron células HEK293 con las construcciones truncadas de p85: p50 o SH3_BCR y con RasGRP1 en los casos indicados (-/+). Las células se procesaron como en el apartado B y la inmunoprecipitación se llevó a cabo con anticuerpos específicos contra los epítopos de cada construcción, αFLAG en el caso de p50 y αHA para SH3_BCR. Todas las muestras se resolvieron y analizaron como en la sección B. Con una flecha se indica la posición de RasGRP1 en los inmunoprecitados.

D - Las células Jurkat se transfectaron con GFP o GFPRasGRP1 y se mantuvieron en cultivo 24h. Pasado este tiempo se aislaron las células positivas para GFP para obtener poblaciones con un porcentaje de células positivas próximo al 100%. Tras 8 horas en cultivo se retiró el suero del medio y las células se mantuvieron en estas condiciones durante 1h. Se recogieron las células y se resuspendieron en HBSS para proceder a su estimulación con αCD3 y αCD28 (1μg/ml cada uno) durante 10min. Se centrifugaron y congelaron las células para posteriormente proceder a la lisis y a la cuantificación de los extractos obtenidos. Se separaron alícuotas para los controles de LT y de activación celular y otras para inmunoprecipitar con anticuerpos contra GFP. Todas las muestras se resolvieron y analizaron como en los apartados anteriores usando los anticuerpos específicos indicados. La flecha marca la posición de PLCγ en el lisado total.

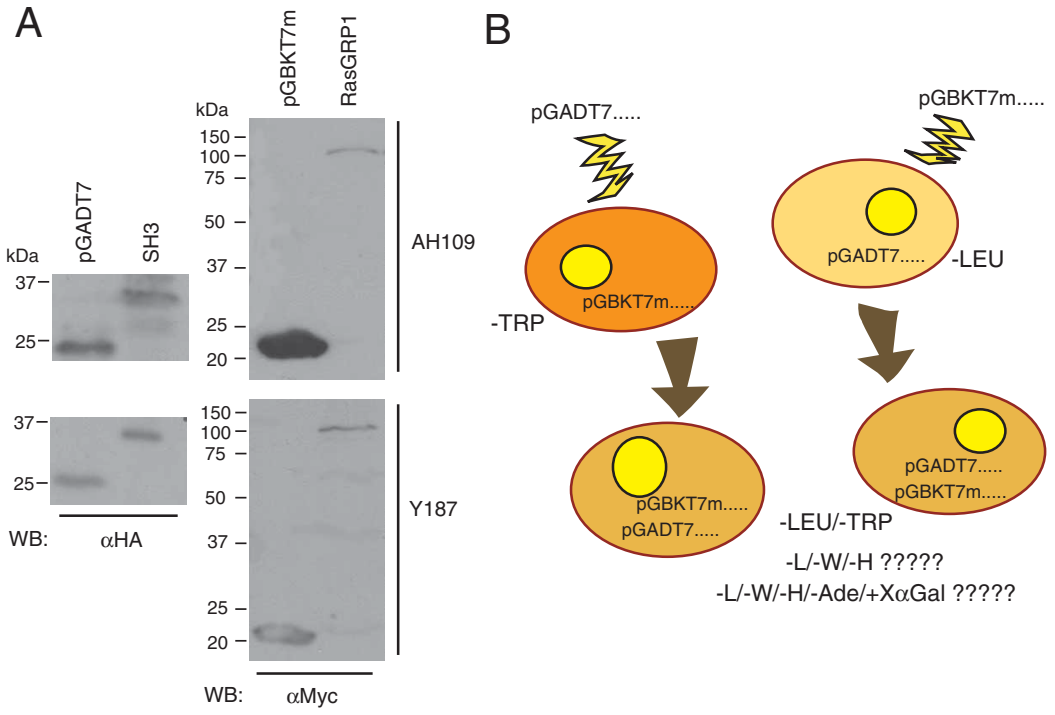


Figura R36 – Expresión de GAL4BD-RasGRP1 y GAL4AD-SH3 en levaduras. Esquema del análisis de doble híbrido.

Se transformaron levaduras Y187 y AH109 con pGADT7, pGADT7-SH3, pGBKT7m o pGBKT7m-RasGRP1. Se mantuvieron las levaduras en los medios de selección correspondientes: pGADT7 y derivados, en ausencia de Leu y pGBKT7 y derivados, sin Trp.

A - Se lisaron las levaduras y los extractos obtenidos se resolvieron por electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras. El dominio de activación del factor de transcripción GAL4 codificado por el vector pGADT7 o la proteína de fusión con el dominio SH3 (pGADT7-SH3) se detectaron por WB usando anticuerpos específicos contra el epítopo HA. En el caso del dominio de unión a DNA de GAL4 expresado a partir de pGBKT7m o la proteína de fusión con RasGRP1 (pGBKT7m-RasGRP1) se usaron anticuerpos contra Myc.

B - Sobre las levaduras transformadas se incorporaron los plásmidos complementarios generando levaduras capaces de crecer en ausencia de Leu y Trp. Estas levaduras se crecieron en medios de baja restricción –Leu/-Trp/-His o de alta –Leu/-Trp/-His/-Ade/+XαGal para analizar la interacción entre SH3 y RasGRP1 que permitiría el crecimiento.

Cepa	Estable	Transformación	-L/-W	-L/-W/-H	-L/-W/-H/-Ade
Y187	pGBKT7m	SH3	✓	✗	✗
	RasGRP1	pGADT7	✓	✗	✗
		SH3	✓	✗	✗
	pGADT7	RasGRP1	✓	✗	✗
	SH3	pGBKT7m	✓	✗	✗
		RasGRP1	✓	✗	✗
AH109	pGBKT7m	SH3	✓	✗	✗
	RasGRP1	pGADT7	✓	✗	✗
		SH3	✓	✗	✗
	pGADT7	RasGRP1	✓	✗	✗
	SH3	pGBKT7m	✓	✗	✗
		RasGRP1	✓	✗	✗

Tabla R2 – Resultados de los análisis de doble híbrido
Se muestran las transformaciones realizadas en las cepas de estudio y su crecimiento en los distintos medios de selección. ✓, crecimiento óptimo en los controles de transformación, ✗, no crecimiento en los controles negativos de interacción, ✗, no crecimiento por ausencia de interacción entre SH3 y RasGRP1.

cabo los controles necesarios para el análisis de la librería de doble híbrido que hemos generado (ver materiales y métodos). La proteínas fusionadas a los dominios de activación o unión a ADN del factor de transcripción GAL4 se expresaron correctamente en las dos cepas de levaduras utilizadas, Y187 y AH109 (FigR36A). Se transformaron las levaduras con el dominio SH3 o con RasGRP1 y sus respectivos vectores vacíos, pGADT7 o pGBKT7m, a modo de control. Estas levaduras se mantuvieron en su medio de selección y se transformaron posteriormente con RasGRP1, SH3 o los vectores vacíos, según correspondía, para que cada clon tuviese todos los componentes del sistema GAL4 y observar así si es funcional al producirse la interacción entre las dos proteínas de interés. Para comprobar esta funcionalidad las levaduras se crecieron en medios restrictivos (FigR36B). A modo de resumen en la TablaR2 se muestran los resultados. Ninguna de las transformaciones fue capaz de crecer en medio ni de baja (-H/-L/-W) ni de alta restricción (-H/-L/-W/-Ade).

RasGRP1 y el dominio SH3 de p85 no interaccionan en un análisis de doble híbrido.

En otro abordaje para la búsqueda de posibles elementos implicados en el movimiento de RasGRP1 a membrana, hemos generamos una librería de doble híbrido para poder detectar interacciones proteína-proteína (ver materiales y métodos). En la actualidad se está llevando a cabo los controles para el posterior análisis de la librería por conjugación.

D) Estudio de la interacción entre las proteínas endógenas, RasGRP1 y p85, en células Jurkat y timocitos.

Para descartar que la asociación que detectábamos tanto en células Jurkat como en Hek293 no se debiese a la sobre-expresión de RasGRP1 estudiamos que ocurría con las proteínas endógenas tanto en la línea celular Jurkat como en timocitos de ratón. Las células Jurkat fueron estimuladas durante 5 y 15 minutos con αCD3 y αCD28 solubles y posteriormente los lisados celulares se utilizaron para llevar a cabo la inmunoprecipitación con anticuerpos contra p85. En todos los experimentos realizados fue necesario un largo tiempo de exposición para poder detectar una señal a la altura de RasGRP1 que correspondía con la banda de la proteína inmunoprecipitada, lo que nos hizo suponer que esta señal procedía de la gran cantidad de p85 que se podía inmunoprecipitar y no de la proteína RasGRP1 asociada (FigR37A). En este sentido el uso de los timocitos suponía una ventaja, ya que a pesar de que RasGRP1 de ratón migra en gel a la altura de p85, aparece como un doblete claramente distinguible. Los timocitos fueron estimulados con αCD3 y αCD28 sobre placa durante 5 y 15 minutos. No se detectó p85 asociado al inmunoprecipitado de RasGRP1 (FigR37B) ni RasGRP1 en el inmunoprecipitado de p85 (datos no mostrados).

Las proteínas endógenas RasGRP1 y p85 no interaccionan por inmunoprecipitación ni antes ni después de la estimulación del TCR.

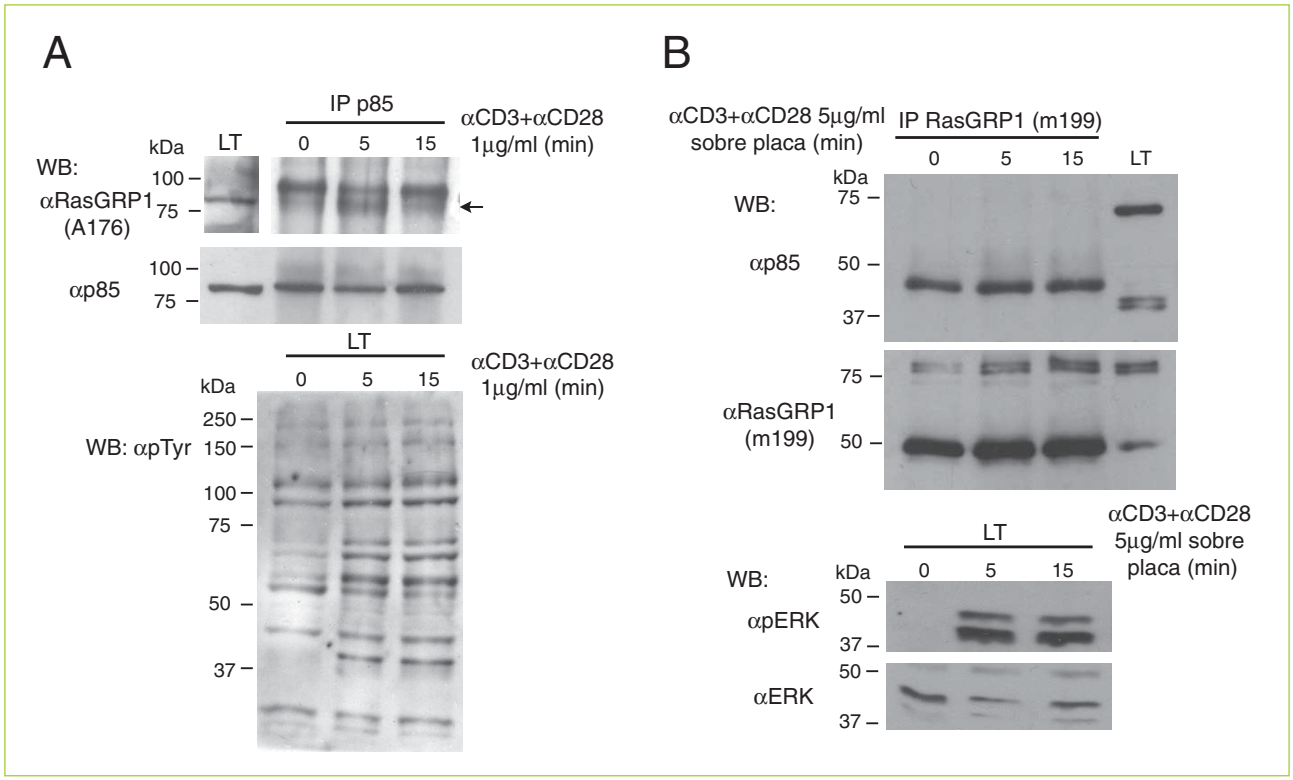


Figura R37 – Interacción de las proteínas RasGRP1 y p85 endógenas en células Jurkat y timocitos de ratón.

A - Se recogieron células Jurkat creciendo de forma exponencial y tras retirar el suero del medio de cultivo se mantuvieron en estas condiciones durante 1h. Las células se pasaron a HBSS y se estimularon con αCD3 y αCD28 solubles (1μg/ml cada uno) durante 5 o 15min. Se recogieron y congelaron para su posterior lisis. Se cuantificaron los extractos celulares obtenidos y se separaron alícuotas para los controles de activación y lisado total (LT) y para los inmunoprecipitados llevados a cabo con un anticuerpo específico contra p85. Todas las muestras se resolvieron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y posterior WB con los anticuerpos indicados. La flecha indica la posición que ocuparía RasGRP1 en el inmunoprecipitado.

B - Se sacrificaron varios ratones de 10 semanas para obtener los timos. Éstos fueron procesados para obtener una suspensión de timocitos que se mantuvieron en un medio sin suero durante 90min. Se depositaron sobre placas recubiertas previamente con αCD3 y αCD28 y tras centrifugar a baja velocidad 2min las células se mantuvieron a 37ºC durante 5 o 15min. Se recogieron todas las células pegadas a la superficie con PBS frío y se procedió a su lisis. Los extractos de proteína fueron cuantificados y procesaron como en el apartado A usando en este caso un anticuerpo contra RasGRP1 para la inmunoprecipitación. Las proteínas de interés se detectaron por WB usando los anticuerpos indicados.

E) Translocación de los mutantes de RasGRP1 en las prolinas de unión a SH3.

Para comprobar si la posible asociación con p85 es realmente necesaria para la translocación generamos mutantes de RasGRP1 en las prolinas de la secuencia consenso de unión a SH3, Pro442 y Pro445 (FigR35A). Ni los mutantes individuales (P442A o P445A) ni el doble mutante (P442_5A) mostraron cambios en la localización parcial a membrana en situación basal (FigR38A) ni en respuesta a las microesferas recubiertas con αCD3 y αCD28 (FigR38B). Todo esto parece indicar que p85 no tiene un papel en la translocación de RasGRP1. Además comprobamos que RasGRP1 sigue translocando a la membrana sólo en presencia de αCD3 sobre la microesfera (FigR38C) condición en la que p85 no se podrá unir a CD28 y por lo tanto se desplazará con más dificultades a la zona de contacto con la microesfera[488].

Comprobamos también con el sistema de activación de las células presentadoras si alguno de los mutantes en las prolinas de unión a SH3 mostraba algún cambio respecto a la proteína silvestre (FigR39). Ni los mutantes sencillos (P442A y P445A) ni el doble mutante (P442_5A) mostraron diferencias en la translocación en presencia de las células presentadoras cargadas o no.

El uso de mutantes en las prolinas predichas para la interacción de RasGRP1 con p85 parece descartar la necesidad de esta asociación para la translocación de RasGRP1 a la membrana plasmática.

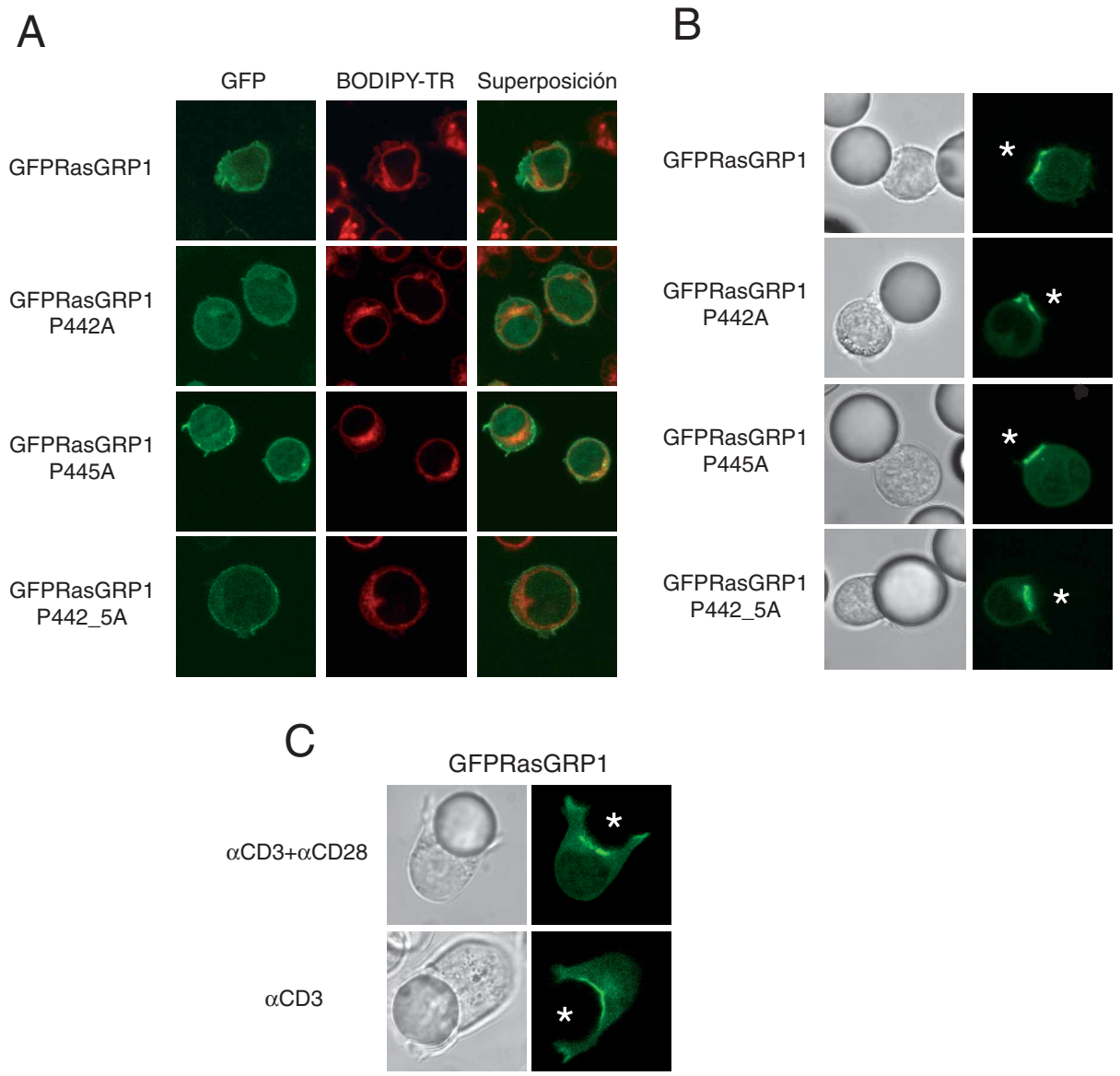


Figura R38 – Localización en ausencia de estímulo y en respuesta a microesferas recubiertas de αCD3+αCD28 de los mutantes GFPRasGRP1P442A, P445A y P442_5A.

A - Se transfectaron células Jurkat con GFPRasGRP1, GFPRasGRP1P442A, GFPRasGRP1P445A o GFPRasGRP1P442_5A. Tras 24h en cultivo se incubaron con Bodipy-TR-ceramida para marcar su aparato de Golgi (panel central en rojo). Las células se depositaron sobre cubreobjetos recubiertos con poli-D,L-lisina para pasados 15min fijar con PFA2% durante 8min. Tras varios lavados las muestras se montaron para su análisis por microscopía confocal. En verde se muestra la localización de GFPRasGRP1 y sus mutantes, en rojo, la tinción del Golgi y en los paneles de la izquierda la superposión de los dos colores.

B - Las células Jurkat se transfectaron con las mismas construcciones que en el apartado A y después de 24h se recogieron y pasaron a HBSS en presencia de microesferas recubiertas con αCD3+αCD28 en una proporción célula:microesfera 1:1. Tras 15min a 37ºC las células se depositaron sobre cámaras de microscopía y se mantuvieron a 37ºC para analizar la localización de las distintas construcciones por microscopía confocal. Se indica con un asterisco la posición de la microesfera.

C - Las células Jurkat se transfectaron con GFPRasGRP1 y 24h después se centrifugaron y resuspendieron en HBSS con microesferas recubiertas de αCD3 o αCD3+αCD28 en una relación célula:microesfera 1:1. Se mantuvieron a 37ºC 15min y se analizaron como en la sección B en el microscopio confocal. Se indica con un asterisco la posición de la microesfera. Todas las imágenes que se muestran son representativas de los campos analizados en cada condición.

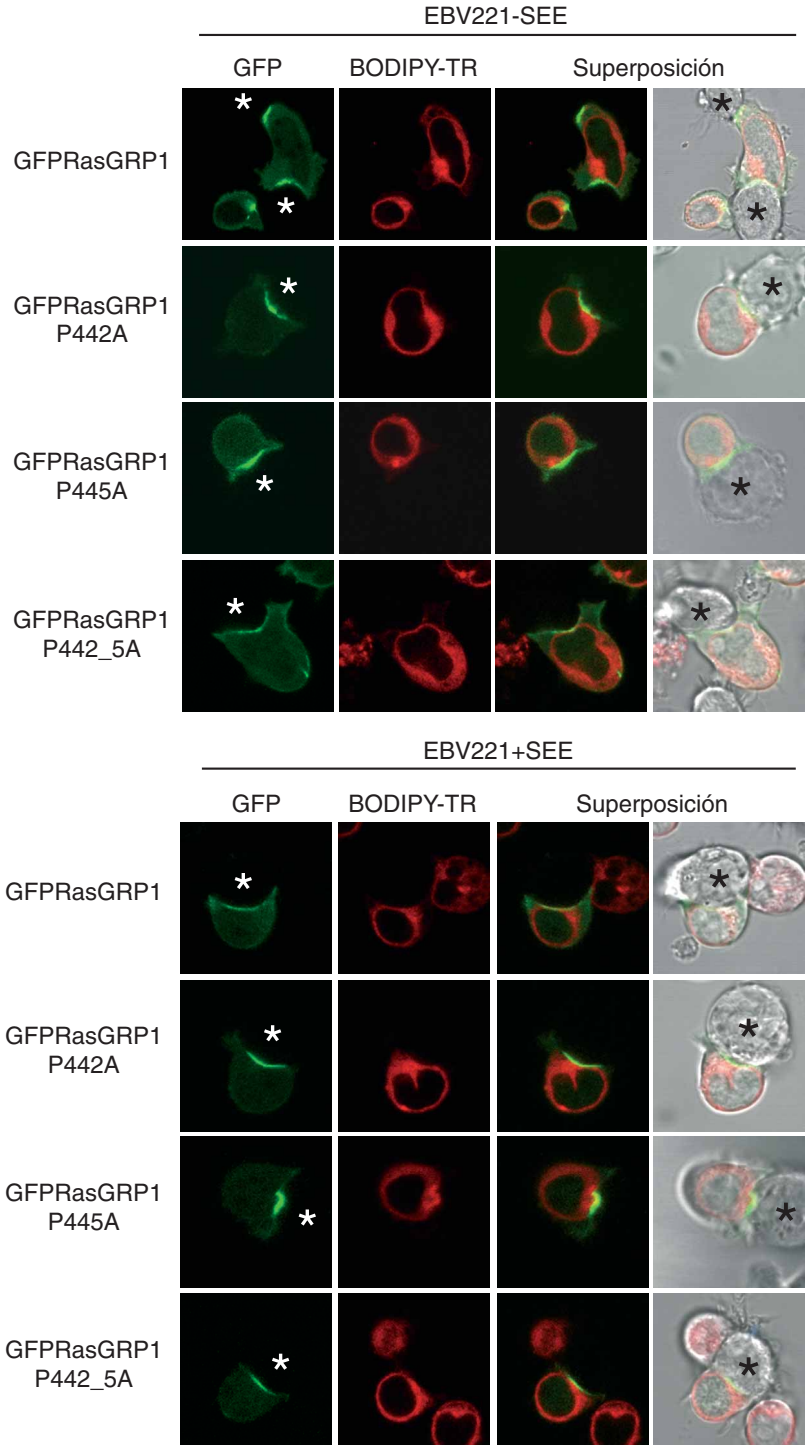


Figura R39 – Translocación de GFPRasGRP1 o sus mutantes P442A, P445A o P442_5A en presencia de las células presentadoras EBV221.
Se transfectaron las células Jurkat con GFPRasGRP1 o sus mutantes GFPRasGRP1P442A, P445A o P442_5A. Se procesaron y analizaron como se indica en la figura R25B. En verde se muestra la localización de la proteína indicada, en rojo el aparato de Golgi y en los dos paneles de la derecha de cada bloque la superposición de ambos colores sólos, o sobre la imagen de contrate de fase. El asterisco indica la posición de la célula presentadora. Todas las imágenes mostradas son representativas de los campos analizados en cada condición.

F) Otros posibles mecanismos implicados en la translocación: fosforilación de RasGRP1.

Al analizar la secuencia de RasGRP1 además de las prolinas de interacción con dominios SH3 aparecen numerosos residuos que pueden sufrir fosforilaciones. Estas modificaciones podrían colaborar en el proceso de translocación o retención en la membrana plasmática de RasGRP1 al permitir el reconocimiento de nuevos puntos de anclaje o provocar cambios estructurales que descubran dominios de la proteína hasta ese momento no expuestos.

En este sentido recientemente se ha publicado la fosforilación de RasGRP1 por PKCs nuevas en respuesta a la activación del TCR[554] y en nuestro laboratorio hemos podido comprobar que en respuesta a la estimulación con αCD3 y αCD28 soluble en el inmunoprecipitado de GFPRasGRP1 se detecta una banda fosforilada en tirosina a la altura de la proteína transfectada (FigR40).

En términos de translocación y activación en membrana de RasGRP1 son necesarios al menos tres elementos: la interacción con Ras, la producción de DAG y el incremento en la concentración de Ca^{2+}.

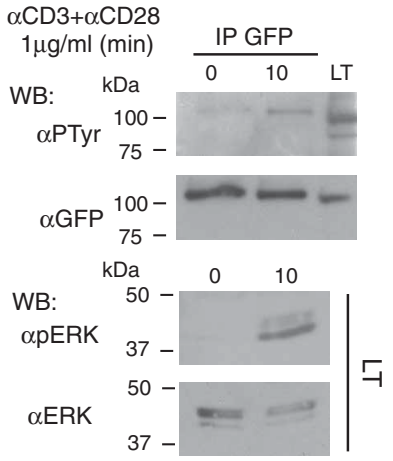


Figura R40 - Fosforilación de RasGRP1 en respuesta a la estimulación con αCD3+αCD28.
Las células Jurkat se transfectaron con GFPRasGRP1 y se mantuvieron en cultivo 24h. Pasado este tiempo se aislaron las células positivas para GFP para obtener poblaciones con un porcentaje de células positivas próximo al 100%. Tras 8h en cultivo se retiró el suero del medio y las células se mantuvieron en estas condiciones durante 1h. Se recogieron las células y se resuspendieron en HBSS para proceder a su estimulación con αCD3+αCD28 (1μg/ml cada uno) durante 10min. Se centrifugaron y congelaron las células para posteriormente proceder a la lisis y a la cuantificación de los extractos obtenidos. Se separaron alícuotas para los controles de LT y de activación celular y otras para inmunoprecipitar con anticuerpos contra GFP. Todas las muestras se resolvieron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y se analizaron por WB con los anticuerpos indicados.

DISCUSIÓN

El trabajo experimental presentado en esta tesis se inició con la intención de generar nuevos modelos que nos permitiesen estudiar los efectos de la alteración de la actividad de DGK. En ese momento en el laboratorio contábamos con información sobre el mecanismo de regulación de DGKα pero desconocíamos cuáles podrían ser sus efectores. Por esta causa, decidimos analizar dos fenómenos en los que los datos bibliográficos indicaban una participación de DGK, la migración celular[159,190,296,480] y la diferenciación tímica y posterior proliferación de los linfocitos T[362,555].

A medida que avanzaba el estudio, se hizo patente la necesidad de generar unos sensores de DAG que nos permitiesen detectar los cambios en los niveles de este lípido provocados por la expresión de mutantes de DGK o la estimulación a través de distintos receptores. Esto nos llevó a realizar un estudio detallado de determinados dominios C1 para comprobar su utilidad como posibles indicadores de DAG en células vivas.

Cada uno de los dominios C1 analizados, a pesar de la homología de secuencia, tenía un comportamiento diferente tanto en situación basal como en presencia del estímulo. En el caso del dominio C1 de RasGRP1 su distribución y su pauta de respuesta a los incrementos de DAG no correspondían con lo observado para la proteína completa, que en principio, necesita de este dominio para responder y translocar en presencia de DAG[62,114,479]. Esta divergencia aumentó nuestro interés respecto al mecanismo de activación y translocación de RasGRP1 por lo que en el último periodo de la tesis centramos nuestros esfuerzos en delimitar cómo se regula esta proteína.

Participación de DGK en la Regulación del Citoesqueleto

Hay numerosas referencias en la bibliografía que relacionan a las DGK con la reorganización del citoesqueleto[159,190,296,480] por lo que decidimos estudiar si la variación de su actividad en células endoteliales afectaba la morfología celular o la migración en respuesta a PDGF. A pesar de que se ha descrito que una actividad DGK inhibible por R59949 se activa por PDGF[111] y se ha supuesto que es DGKα, nuestros resultados demuestran que la actividad de la proteína DGKα transfectada disminuye en células PAE, en respuesta a PDGF. Otros laboratorios, sin embargo, han descrito que en presencia de HGF[94] o VEGF-A[28], en estas mismas células, la actividad DGKα aumenta.

Estos tres factores de crecimiento, PDGF, HGF o VEGF-A, son capaces de inducir migración celular usando los mismos mecanismos de acción[146], por lo que resulta difícil de explicar la diferente regulación de la actividad DGK. No obstante, hay que considerar que durante el proceso de angiogénesis cada uno de estos factores participa en momentos concretos y con distintas funciones[106]; estas diferencias pueden ser la consecuencia de variaciones entre sus cascadas de señalización, como podría ser la activación o inhibición de DGK. VEGF y HGF actúan principalmente en los primeros pasos de la angiogénesis cuando un capilar ya existente se disgrega y sus células proliferan para migrar y generar un nuevo vaso; mientras que PDGF, aunque es necesario también para el crecimiento y división de las células, colabora en la formación del tubo que va a dar lugar al nuevo vaso sanguíneo[106]. La importancia de una regulación diferencial de DGK a lo largo del proceso de angiogénesis, podría explicarse teniendo en cuenta el papel de RasGRP3 en este contexto. Cuando RasGRP3 se activa de forma prolongada con PMA, genera vasos sanguíneos aberrantes al comprometer la migración e inducir mayor proliferación de las células endoteliales[395]. Por lo tanto la menor o mayor actividad de DGK inducida por los factores de crecimiento, podría permitir, a través de la regulación de RasGRP3, mantener un equilibrio entre migración y proliferación a lo largo del proceso de angiogénesis, diferenciando así las distintas etapas.

En presencia de los mutantes constitutivamente activos de DGK, MyrGFPDGKα o Δ196DGKα, se dificulta la generación de los lamelipodios característicos de la respuesta a PDGF. Esta mayor actividad no se traduce en defectos en la reorganización del citoesqueleto o en la adhesión celular pero sí en una clara incapacidad para desarrollar un lamelipodio del tamaño apropiado. Esto implica que la actividad DGK no bloquea totalmente la acción de Rac pero que la dinámica del citoesqueleto está alterada ya que los filamentos de actina no pueden crecer hasta el tamaño requerido para formar el lamelipodio. Este efecto tiene al menos dos explicaciones, o bien Rac no tiene una cinética de activación apropiada que permita un crecimiento correcto de los filamentos de actina, o bien los elementos de anclaje de las fibras de estrés en la membrana del frente de avance están alterados, ya sea en su número o en su disposición, dificultando el crecimiento[155,447]. Esta última posibilidad queda prácticamente descartada ya que la tinción con paxilina no presenta diferencias entre las células control y las que expresan Δ196DGKα o MyrGFPDGKα, lo que implica que los filamentos de actina una vez que alcancen la membrana podrán anclarse para generar la tensión necesaria para su crecimiento. Por otro lado, en presencia de una forma de Rac constitutivamente activa el defecto desaparece, indicando que los posibles efectores de la activación de DGK deben actuar por encima de Rac.

Estos efectores podrían responder o bien a la bajada de DAG o al incremento de PA. Un posible candidato son las quimerinas que en ausencia de DAG no se pueden activar impidiendo que el ciclo Rac-GTP/Rac-GDP funcione a la velocidad requerida y por lo tanto la polimerización de actina será menor, lo que dificultará el crecimiento del lamelipodio. En el sentido contrario, las quimerinas se activan in vitro por PA[5,61], así que en presencia de una DGK que genera PA la proteína será más activa lo que también alterará los niveles de Rac-GTP en la célula y por lo tanto la dinámica del citoesqueleto de actina. Hasta el momento se desconoce si las células endoteliales expresan alguna de las formas de quimerina. Otra posibilidad serían las PKC que una vez activadas por el DAG pueden fosforilar a Tiam[136], un GEF de Rac, y activarlo; una menor cantidad de DAG provocaría un descenso en la actividad de Tiam y una bajada en los niveles de Rac-GTP. En el caso de PA, otra de sus posibles dianas relacionadas con el control del citoesqueleto son las enzimas PI4P5K[228,480] que al generar PI4,5P_2 pueden atenuar la actividad de Vav[170], otro GEF para Rac; por lo que, un aumento de PA provocaría también un descenso en la carga de GTP de Rac.

Es interesante destacar que la alteración de la morfología que observamos en presencia de una mayor actividad DGK es reproducible en fibroblastos y no parece ser dependiente de DGKα ya que una forma constitutivamente activa de DGKζ provoca los mismos efectos (datos no mostrados). Si tanto DGKα como DGKζ, a pesar de sus diferentes mecanismos de activación (Tablal1), están relacionadas con la regulación del citoesqueleto, esto implica que en nuestro estudio estamos observando un efecto dependiente de una alteración genérica de la actividad DGK. Quizás, que la actividad DGKα se regule

por PDGF es indicativo de su papel en este contexto pero habría que anular su actividad de forma independiente para comprobarlo. En este sentido, la reducción de su expresión en células endoteliales usando ARN de interferencia, bloquea el proceso de angiogénesis[28].

Recientemente se ha descrito que también DGKγ es capaz de inducir cambios en el citoesqueleto de actina. En este estudio se demuestra que la presencia de un mutante inactivo de DGKγ es capaz de provocar un aumento en los niveles de Rac-GTP que correlaciona con la generación de lamelipodios en ausencia de estímulo, y que DGKγ colocaliza con actina y Rac en la periferia celular[489]. También analizan el efecto en fibroblastos de la expresión de un mutante constitutivamente activo de DGKγ (equivalente a Δ196DGKα) y de la construcción Δ196DGKα. Las imágenes de microscopía que muestran indican que, aunque el efecto de DGKγ es más significativo, ambas construcciones provocan cambios similares a los que nosotros observamos en presencia de nuestros mutantes, ya sea Δ196DGKα o MyrGFPDGKα. No se detectan grandes lamelipodios y en el caso de DGKγ, las células ni siquiera son capaces de comenzar el crecimiento direccional. Probablemente esto es el resultado de que la actividad DGKγ sí afecta la adhesión sobre fibronectina[489] mientras que, tanto en sus experimentos como en los nuestros, la expresión de Δ196DGKα no altera este proceso (datos no mostrados). Por lo tanto, mientras que DGKγ afecta tanto a la adhesión como a la actividad de Rac, DGKα tendría un papel más restrictivo controlando tan sólo la dinámica de crecimiento de las fibras de actina. Una vez más estos datos demuestran la relevancia de la actividad DGK para permitir una respuesta más versátil, en este caso, en términos de la reorganización del citoesqueleto.

Otro abordaje para intentar estudiar los efectos derivados de la alteración de la actividad DGK fue la generación de unos ratones transgénicos para una forma constitutivamente activa, Δ196DGKα, o un mutante sin actividad catalítica, DGKαinactiva. Elegimos estas dos construcciones con la intención de analizar los efectos de un incremento o descenso incontrolado de DAG. Δ196DGKα, que es activa en ausencia de estímulo, debería bajar la cantidad de DAG y por lo tanto disminuir todas aquellas señales dependientes de este lípido. En el lado opuesto, una expresión del mutante DGKαinactivo lo suficientemente alta como para actuar como un dominante negativo, bloquearía la activación de la enzima endógena impidiendo la bajada de los niveles de DAG y como consecuencia un incremento en las señales dependientes de este lípido.

La expresión de ambos transgenes estaba dirigida por el promotor de CD2[66] que permitía evitar la regulación a la que está sometida DGKα a lo largo de la diferenciación tímica y durante la proliferación de los linfocitos T[362,417]. Aunque no conseguimos generar ninguna línea que expresase alguno de los dos transgenes, trabajos posteriores en nuestro laboratorio han demostrado que la presencia de una forma constitutivamente activa de DGKα es capaz de bloquear la activación de la vía de Ras en linfocitos[229,417].

Funcionalidad de los Dominios C1 como Biosensores de DAG

Además del papel de DGKα controlando los niveles de DAG para modular la activación de los linfocitos T, también se ha descrito la importancia de DGKζ. En los ratones deficientes para esta proteína, en respuesta a la estimulación del TCR, los linfocitos aumentan la señalización de la vía de Ras y proliferan más[556]. Por lo tanto las células linfoides constituyen un buen modelo para analizar en detalle la cinética de producción y posterior degradación de DAG ya que está estrictamente regulada. Para realizar este estudio clonamos los dominios C1 de algunas de las proteínas que se expresan en células T para fusionarlos a GFP y obtener así unas herramientas que nos permitiesen detectar DAG en células vivas.

Todos los dominios C1 seleccionados, C1aPKCθ, C1bPKCθ, C1β2quimerina y C1RasGRP1, conservan los residuos característicos de los dominios C1 típicos capaces de unir ésteres de forbol. Sin embargo, el dominio C1aPKCθ se comporta como atípico y no responde a la adición de PMA o PDBu. Se ha descrito que los dominios C1a tienen menor afinidad que los C1b[433] y de hecho C1a de PKCδ y PKCθ son incapaces de unir PDBu[209,433]. Esta deficiencia se resuelve si el residuo en posición 9, Pro en el caso de C1aPKCθ y Gly en PKCδ, se muta a una Lys que es el residuo que presentan otros dominios C1a en esta posición[433]. En la estructura del dominio C1, el residuo 9 se localiza en la base de uno de los bucles de interacción con PMA por lo que es posible que la presencia de una Pro, aminoácido rígido que provoca cambios en el giro de la cadena polipeptídica, o una Gly, que al ser tan pequeña puede alterar la distribución de los residuos adyacentes, de lugar a un cambio conformacional que altera la unión a los ésteres de forbol.

Aunque C1aPKCθ es incapaz de unir PMA, cuando acompaña a C1bPKCθ aumenta la afinidad de éste por la membrana plasmática y así la construcción que combina estos dos dominios, C1a+C1bPKCθ se localiza en situación basal en esta membrana. Este efecto no parece ser dependiente de la región entre los dos dominios ya que una construcción del C1a más larga, que contiene estos residuos, se comporta como el dominio C1aPKCθ en solitario (datos no mostrados). Los dominios C1a de las

PKC clásicas son necesarios para, una vez localizada la proteína en la membrana por la interacción del dominio C2 con Ca^{2+}, se favorezca el anclaje y la consiguiente aproximación del dominio C1b a esta ubicación[39,327,456]. En el caso de las PKC nuevas sus dominios C1a tienen distinto comportamiento. En PKCε y PKCη, que responden más rápido a ésteres de forbol y no requieren PS, los dos dominios C1 tienen una afinidad similar por DAG por lo que van a participar de forma equivalente y aditiva en la unión a membrana[455]. Sin embargo, en PKCδ y PKCθ, cuya translocación es más lenta y dependiente de PS, los dominios C1 tienen distinta afinidad por DAG y en consecuencia cada uno tiene una función en la interacción con la membrana[455]. En PKCθ, según indican nuestros resultados, el dominio C1b sería capaz de responder a cambios en los niveles de DAG o a la adición de ésteres de forbol, mientras que el C1a definiría la unión preferencial a la membrana plasmática, rica en PS. Esta especificidad por un tipo concreto de membrana puede ser dependiente de la interacción con proteínas, como se ha descrito para otros dominios C1[353], o se puede explicar por analogía con la pareja de dominios C1 de PKCδ. En presencia de PS estos dominios rompen las interacciones intramoleculares existentes entre ellos para poder unir DAG[455] y en el caso del tandem de PKCθ, podría ocurrir lo mismo. Para que el C1b pueda unir DAG va a necesitar la presencia de PS que separe al C1a dejando libres los residuos de interacción y esto, sólo puede ocurrir en un contexto rico en PS, como es la membrana plasmática. En el caso de nuestros ensayos in vitro, no se aprecian diferencias en la unión a vesículas, simulando membrana nuclear o plasmática, ya que en estas condiciones el tandem de los C1 se asocia totalmente a la fracción donde se aislan las vesículas, independientemente de su composición. Probablemente la concentración de sales que usamos para los ensayos puede alterar las interacciones intramoleculares dejando a los dos C1 expuestos, y en esta situación, podrían cooperar ambos en la unión a las vesículas, como se ha descrito para otras combinaciones de C1[196,466].

El DAG producido a partir de la vía de PLC o la combinación de PLD y PAP tiene distinta composición de ácidos grasos y provoca distintos efectos en la célula[183]; de hecho en células endoteliales, sólo el DAG derivado de la acción de PLC es capaz de activar las PKC[370]. Este tipo de datos son indicativos de una especialización en la unión de DAG que nosotros hemos confirmado al estudiar la localización subcelular de los dominios C1. C1bPKCθ se comporta como un sensor de SAG cuando éste aumenta en membrana plasmática, gracias a la mayor afinidad que tiene por este tipo de DAG en comparación con un DAG típico de membranas internas. Sin embargo C1RasGRP1 se une mejor a vesículas con DAG de ácidos grasos saturados y como consecuencia no se desplaza a la membrana plasmática cuando aumenta la actividad PLCγ y, en presencia de PMA, regresa rápidamente a localizaciones internas donde se encuentra con este tipo de DAG. No obstante, no podemos descartar la participación de otros lípidos o proteínas que colaboren en mantener estas distribuciones[182,227,445]. Por ejemplo, en el caso de C1β2Quimerina, aunque no muestra una gran especificidad por membranas internas en los ensayo de unión a vesículas, su localización en ausencia de estímulo en estas membranas y su incapacidad para responder a la estimulación con microesferas recubiertas con αCD3+αCD28 (datos no mostrados), puede deberse a la interacción con Tmp21-I, una proteína de RE[514].

Para intentar explicar la especificidad por distintos DAG analizamos detenidamente los aminoácidos de C1bPKCθ y C1RasGRP1 que están implicados en la unión a membranas. Los estudios con C1bPKCγ indican que la interacción con las micelas tiene lugar a través de los dos bucles de unión de PMA y la región que participa en la coordinación del segundo ión de Zn^{2+}, por lo que buscamos variaciones entre estos residuos[532]. La única diferencia significativa que detectamos fue la presencia en la posición 5, implicada en la estabilización de los residuos que coordinan el segundo ión de Zn^{2+}, de ácido glutámico en el caso de C1RasGRP1 y valina en el de C1bPKCθ. Generamos dos mutantes que intercambiaban estos residuos C1RasGRP1E_V y C1bPKCθV_E y ninguno de ellos mostró diferencias en la localización subcelular ni en la respuesta a PMA, en comparación con las construcciones originales. Quisimos comprobar si la presencia de los residuos cargados positivamente que siguen a los dominios C1 de todas los miembros de la familia de RasGRP[479] jugaban algún papel en la especificidad por distintos DAG y generamos dos mutantes que intercambiaban sus extremos C-terminal, C1RasGRP1KKR_GIN y C1bPKCθGIN_KKR. Una vez más, ninguno de ellos mostró diferencias en cuanto a su distribución intracelular.

Teniendo en cuenta estos datos, parece que la especificidad por distintas especies de DAG no va a depender de residuos puntuales sino de la configuración de los bucles de unión a PMA, que a su vez es función del plegamiento de dominio completo. Así por ejemplo, la estructura del dominio C1 de Munc13_1 (FigD1), obtenida recientemente por RMN, demuestra que la presencia de residuos distintos a los de C1bPKCδ en posiciones no relevantes, en principio, para la unión de ésteres de forbol, induce un cambio sutil en el plegamiento del dominio[430]. Esta diferencia provoca que el triptófano en posición 22, altamente conservada, se sitúe hacia el interior del surco impidiendo la entrada de ésteres de forbol, lo que correlaciona con la menor afinidad del dominio C1 de Munc13_1 por PMA o PDBu[430]. Este tipo de cambios en la disposición de los bucles también se han relacionado con las diferencias descritas en cuanto a la capacidad de los dominios C1 de penetrar la membrana[13] o la especificidad por distintos análogos de DAG[516].

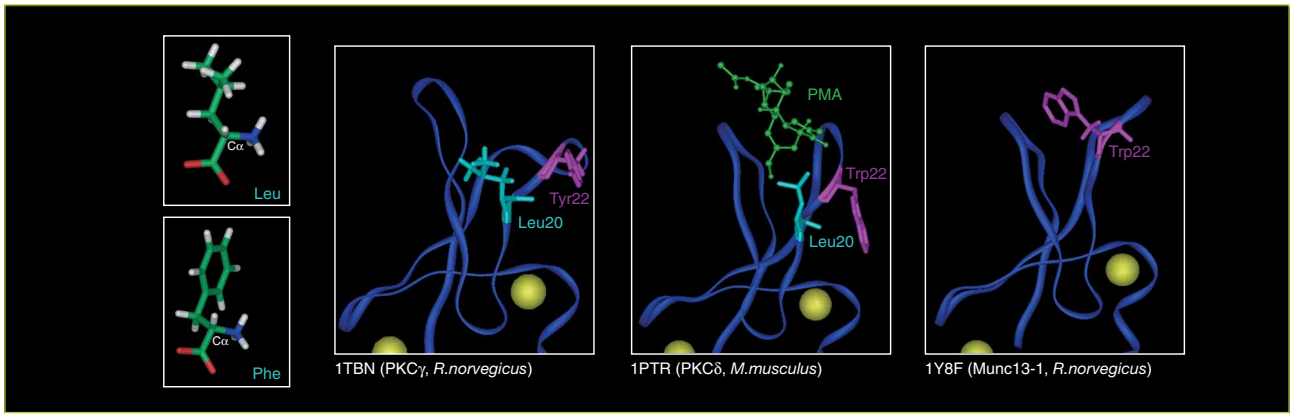


Figura D1 – Relevancia del plegamiento del dominio C1 en la configuración de los residuos implicados en la interacción con ésteres de forbol.
Se representan los dominios C1b de PKCγ (PDB ID:1TBN), C1b de PKCδ (PDB ID:1PTR) y C1 de Munc13-1 (PDB ID:1Y8F) indicando en magenta la posición 22 que bloquea el surco de unión de PMA (en verde) en el C1 de Munc13-1. En cian el residuo 20, en C1bPKCγ y C1bPKCδ Leu y en C1RasGRP1 Phe. Se representa la estructura de estos aminoácidos en solitario como indicativo de los cambios que puede generar su sustitución en una cadena polipeptídica. El cambio de residuo en esta posición, sumado a las variaciones en la disposición de los bucles de unión a ésteres de forbol, define la especificidad de C1RasGRP1 por determinadas especies de DAG.

Un modelo del C1 de RasGRP1, realizado por acoplamiento sobre las estructuras de otros dominios cristalizados, ha permitido concluir que su surco de interacción es menos profundo y más estrecho que el de C1b de PKCγ lo que implica que la disposición en el espacio de los residuos que constituyen el surco de unión es diferente[401]. Fundamentalmente, la Phe 20 que es más grande que la Leu en la misma posición en C1bPKCγ y C1bPKCδ, ocupa más espacio y al estar en la base del surco, va a reducir su profundidad (FigD1). Este cambio en el surco de unión dificultará el reconocimiento de DAG de ácidos grasos insaturados ya que es más voluminoso que el compuesto por saturados. Por lo tanto DOG encajará mejor en el surco de unión que SAG explicando la especificidad por membranas internas frente a plasmática del dominio C1RasGRP1.

Si comparamos el comportamiento de los dominios C1 aislados con el de las proteínas que los contienen, C1bPKCθ y C1a+C1bPKCθ translocan en respuesta a las microesferas recubiertas de αCD3+αCD28 tal como lo hace la proteína completa. No obstante, hay que destacar que los dominios C1 en un primer momento se localizan en la zona de contacto célula:microesfera para posteriormente distribuirse por toda la membrana plasmática, mientras que PKC es retenida en el punto inicial. Esta diferencia es consecuencia de los contactos de PKC con otras proteínas que la mantendrán retenida en esta posición[504]. Cuando estimulamos con células presentadoras PKC se sigue comportando igual pero los dominios C1 no se desplazan por la membrana sino que quedan retenidos en la zona de contacto célula:célula. Esto tiene al menos tres explicaciones: la producción de DAG es menor y por lo tanto no hay suficiente DAG como para que lo podamos detectar en todo el contorno celular, en las zonas de no interacción hay una actividad enzimática capaz de destruir el DAG que se produzca o la alteración de la morfología de la membrana en el contacto entre las dos células es tal que crea una barrera física para el desplazamiento de los lípidos a lo largo de la membrana. Si consideramos la tranlocación de C1a+C1bPKCθ se detecta algo de señal en toda la membrana aunque con una clara acumulación en la zona de contacto (datos no mostrados); en el caso de C1bPKCθ detectamos muchas células en las que la translocación es parcial y hay señal en el interior celular lo que es indicativo de una menor concentración de DAG en toda la membrana plasmática, ya sea porque se produce menos, porque se degrada o porque no se desplaza. Probablemente la distribución de DAG en estas condiciones sea consecuencia de la combinación de estos tres factores u otros pero hasta ahora no disponemos de datos que nos permitan distinguir entre estas opciones. Si por inmunofluorescencia analizamos la fosforilación de ERK, que en estas circunstancias es dependiente de los niveles de DAG[402], sólo detectamos señal cuando estimulamos con las células presentadoras y no con las microesferas (datos no mostrados). Esto indica que el resultado final de este aumento localizado de DAG es una respuesta más eficiente al acumularse toda la señal del lípido en el punto donde es necesario y no diluirse a lo largo de la membrana. Por lo tanto, al poder controlar de forma independiente la localización del lípido activador y de la proteína efectora, la célula puede modular aún más la respuesta, en función de la cantidad de cada uno de estos elementos que se acumule en una región concreta de la membrana.

Modelo de Activación de RASGRP1

Aunque los dominios C1 de PKC y la proteína completa presentan pequeñas diferencias en cuanto a la cinética de translocación en respuesta a DAG, el movimiento de PKC es dependiente de sus dominios C1 y de la actividad PLC. Sin embargo, en el caso de RasGRP1, a pesar de presentar un dominio C1 típico y, en respuesta a microesferas recubiertas de αCD3+αCD28, translocar a membrana plasmática en paralelo a la producción de DAG, esta localización es independiente de ambos factores. Si analizamos la translocación en presencia de células presentadoras, la proteína localiza en membrana plasmática aún es ausencia de superantígeno y de hecho es capaz de translocar incluso cuando se bloquea la señalización con diferentes inhibidores farmacológicos, como PP2 o U73122. La única explicación para esta distribución es la interacción de RasGRP1 con alguna proteína cuya localización no dependa de estímulo pero que sea capaz de situarse en la zona de contacto cuando las dos células se aproximan. Una proteína candidata que cumple estos dos requisitos es Ras que, además de interaccionar de forma estable con RasGRP1 en ensayos in vitro[114], puede localizar en membrana plasmática[171].

H-Ras, N-Ras y K-Ras se asocian con membranas gracias a la modificación de ciertos residuos de la región hipervariable de su extremo C-terminal. La farnesilación de la Cys de la secuencia CAAX es la primera señal que va a permitir la unión a membrana y la segunda es distinta según la forma de Ras: H-Ras sufre dos palmitoilaciones, N-Ras una y K-Ras tiene una región polibásica que permite su interacción con las cargas negativas de la membrana[171]. En función de esta segunda señal de localización cada proteína se asocia con distintos dominios de membrana[76,406]. Así, H-Ras unida a GDP, localiza fundamentalmente en membrana plasmática repartida aproximadamente al 50% entre rafts y no rafts[405] y cuando se activa y une GTP abandona los rafts para poder actuar sobre sus efectores[348,376]. N-Ras se distribuye entre membranas interna y plasmática[171] y K-Ras, gracias a su carga positiva, interaccionа con los lípidos aniónicos de la cara interna de la membrana plasmática generando pequeños dominios al reclutar esta clase de lípidos[171]. El primer paso de la farnesilación tiene lugar en el citosol pero los dos últimos, proteolisis y carboximetilación se desarrollan en el RE desde donde estas proteínas tienen que desplazarse a su destino final[171]. H-Ras y N-Ras pasan a través del Golgi donde unen los palmíticos correspondientes y siguen la ruta del tráfico vesicular convencional hasta la membrana plasmática[16]. En el caso de K-Ras su transporte no depende de vesículas y se cree que se desplaza por difusión hasta la membrana plasmática[16]. Una vez en sus respectivas localizaciones se ha podido comprobar que las tres formas de Ras ciclan entre el Golgi y la membrana plasmática, K-Ras lo hace dependiendo de un incremento de Ca^{2+} y por lo tanto de un estímulo[135], y H-Ras y N-Ras en función de su estado de palmitoilación; cuando pierden los palmíticos se desplazan a Golgi donde vuelven a ser modificadas y trasladadas de nuevo a la membrana plasmática; este movimiento parece depender exclusivamente de la vida media de la palmitoilación y no de una señal externa[157,397].

Considerando esta información, la interacción de RasGRP1 con alguna de las formas de Ras permitiría explicar su asociación a membrana plasmática en situación basal o durante el contacto con la APC en ausencia de señal (ya sea por la adición de inhibidores que la bloqueen o por la falta de superantígeno). Tras la detección de la célula presentadora, aunque no haya señalización, algunos de los elementos de membrana se reorganizan de forma temporal para reconocerla[143,386], entre ellos, los microdominios como rafts[344], o quizás los que se constituyen en torno a K-Ras. Esta reestructuración puede conducir a su agrupación momentánea lo que permitiría observar la concentración de la señal de RasGRP1 en la zona de contacto. Confirmando esta hipótesis, el mutante incapaz de unir Ras, RasGRP1R271E, se detecta exclusivamente en citosol en ausencia de estímulo.

La interacción constitutiva de RasGRP1 con Ras puede enmascarar otras señales que son necesarias para la activación y que colaborarían en la translocación, mantenimiento y/o correcta ubicación de la proteína en la membrana. Este sería el caso de la actividad PLC, que según nuestros datos con la proteína silvestre no parece ser necesaria para la translocación de RasGRP1 pero sí para su activación. Sin embargo, cuando se estimula con APC cargadas con superantígeno, el mutante incapaz de unir Ras sólo localiza en membrana plasmática cuando sus manos de Ca^{2+} y su dominio C1 pueden unir Ca^{2+} y DAG respectivamente. Esto indica que estas dos señales no participan estrictamente en la localización pero que sí son relevantes en la interacción con la membrana y posiblemente sea esto lo que les permite activar la proteína, ya que RasGRP1 ha de realizar su función en este contexto. La unión de Ca^{2+} probablemente induzca un cambio conformacional que favorece la actividad como se ha descrito para otras proteínas[278] y en el caso del dominio C1 su unión a DAG conlleva un mayor anclaje y penetración en la membrana que podría implicar la activación de la proteína como se ha descrito para algunas PKC[32,39].

Los resultados del mutante incapaz de unir Ras y el doble mutante que además tiene un C1 no funcional indican que, en la proteína completa y en respuesta a estímulo, el dominio C1 está uniendo el DAG que se está generando en la membrana plasmática a pesar de su

mayor afinidad por el característico de las membranas internas. Se ha descrito que en respuesta a PMA la localización en membrana plasmática de RasGRP1 depende no sólo de su dominio C1 sino también de la presencia de sus extremos N- y C-terminal que de alguna forma favorecen esta localización[479]. El extremo N-terminal de RasGRP2 es necesario para su interacción con actina y para su localización en membrana plasmática en respuesta a la reorganización del citoesqueleto inducida por Vav[64]. En el caso de RasGRP1 también se ha comprobado que tanto Vav como Rac constitutivamente activos son capaces de inducir la translocación aunque no se ha determinado la región implicada en la interacción[63]. Quizás la unión de actina a RasGRP1 sea necesaria para facilitar la interacción del dominio C1 con el DAG producido por la PLC en esta localización obviando así, en estas condiciones, su elevada afinidad por el DAG de membranas internas. Este tipo de regulación se ha demostrado también en otras proteínas como Akt cuya localización específica en determinadas regiones de la membrana no depende sólo de su dominio PH, sino también de la porción C-terminal de la proteína[234]. Otro ejemplo sería PKCα que puede localizar en membrana plasmática gracias a la asociación de PIP_2 con parte de su dominio C2 y en ausencia de la región implicada en la unión, la proteína se asocia con el RE[125].

Si tenemos en cuenta los datos de translocación de RasGRP1 en respuesta a la estimulación de TCR, la asociación permanente de su dominio C1 aislado con Golgi y RE y que al expresar en células adherentes la proteína completa, ésta localiza en membranas internas[62] (datos no mostrados), concluimos que en los linfocitos, en ausencia de estímulo, el dominio C1 permanece oculto y que tras la activación queda disponible para la interacción con DAG. Este tipo de mecanismo que permite la exposición del dominio C1 se ha descrito en algunas PKC[352,455] o en β2Quimerina[65]. En el caso de PKC parece ser necesaria la presencia de Ca^{2+} o lípidos de carga negativa que permitan romper las interacciones intramoleculares[455] y en β2Quimerina todavía se desconocen los elementos que participan en la apertura de la estructura que deja el dominio C1 al descubierto. En RasGRP1 podrían estar implicados al menos tres factores: la unión de Ca^{2+}, la fosforilación en Tyr o en Ser/Thr. En cuanto al Ca^{2+}, el tratamiento de las células con ionomicina no es suficiente como para permitir la translocación de la proteína (datos no mostrados). Las fosforilaciones en Ser/Thr y en Tyr, que nosotros hemos descrito, se producen en respuesta a la estimulación[402] aunque hasta el momento sólo se ha detectado uno de los residuos implicados, Thr183 que se fosforila por PKCθ[554]. La localización de esta Thr en el bucle de conexión entre el dominio REM y Cdc25 la convierte en un buen candidato para modificar el estado de activación de la proteína ya que esta región, en la proteína Sos, está implicada en la regulación de la actividad catalítica por la unión de una molécula de Ras-GTP que permite un cambio conformacional que induce la activación[448]. En el caso de RasGRP1, podríamos hipotetizar que, en ausencia de estímulo, esta región está bloqueada por la región reguladora de la proteína, manos de Ca^{2+} y dominio C1, y cuando se fosforila la Thr183 y aumentan los niveles de Ca^{2+} se permite el desplazamiento de todo el extremo C-terminal, lo que conlleva la exposición y anclaje del dominio C1 a la membrana quedando libre la zona para la interacción de la molécula de Ras-GTP que induce la activación. De los residuos descritos como relevantes para esta interacción[448], sólo uno está conservado entre los 4 miembros de la familia de RasGRP pero en esta zona en Sos tampoco se han descrito residuos que se puedan fosforilar por lo que en RasGRP quizá el cambio que provoca la activación no sea dependiente de la unión a Ras-GTP, sino simplemente de la fosforilación y desplazamiento de la región reguladora.

A modo de resumen indicamos paso por paso un posible modelo de la activación de RasGRP1 (FigD2):

1• En ausencia de estímulo GFPRasGRP1 une Ras, lo que le permite localizar parcialmente en membrana plasmática. Esta situación correlaciona con un aumento de la carga de GTP de Ras aunque somos incapaces de detectar la señal de pERK por inmunofluorecencia. La interacción de RasGRP1 con Ras probablemente no sólo permite cierta localización en membrana plasmática sino también en endomembranas donde las distintas formas de Ras se están modificando para dirigirse a la membrana plasmática. Si las células transfectadas con GFPRasGRP1 se fijan, lo que permite que parte de la señal de la proteína citosólica se pierda, se puede observar una distribución parcial tanto en membranas plasmática como internas (datos no mostrados).

En respuesta a estímulo la proteína sufre un cambio conformacional probablemente dependiente de la unión de Ca^{2+} y de fosforilación que permite la exposición del dominio C1 que se unirá al DAG generado en la membrana plasmática gracias a la colaboración de los extremos N- y C-terminal de la proteína y del citoesqueleto de actina.

2• La proteína anclada a DAG en la membrana y fosforilada o bien deja expuesto el bucle de conexión entre el dominio REM y Cdc25 o bien cambia su conformación de tal forma que el sitio catalítico de RasGRP1 toma la conformación apropiada y permite el intercambio de GDP por GTP. Aumenta aún más la carga de Ras con GTP y detectamos pERK por inmunofluorecencia.

3• Mientras que RasGRP1 mantenga su conformación activa será capaz de permitir la carga de Ras con GTP lo que a su vez impedirá una interacción estable entre ambas moléculas favoreciendo la producción continua de Ras-GTP. Cuando las condiciones de activación

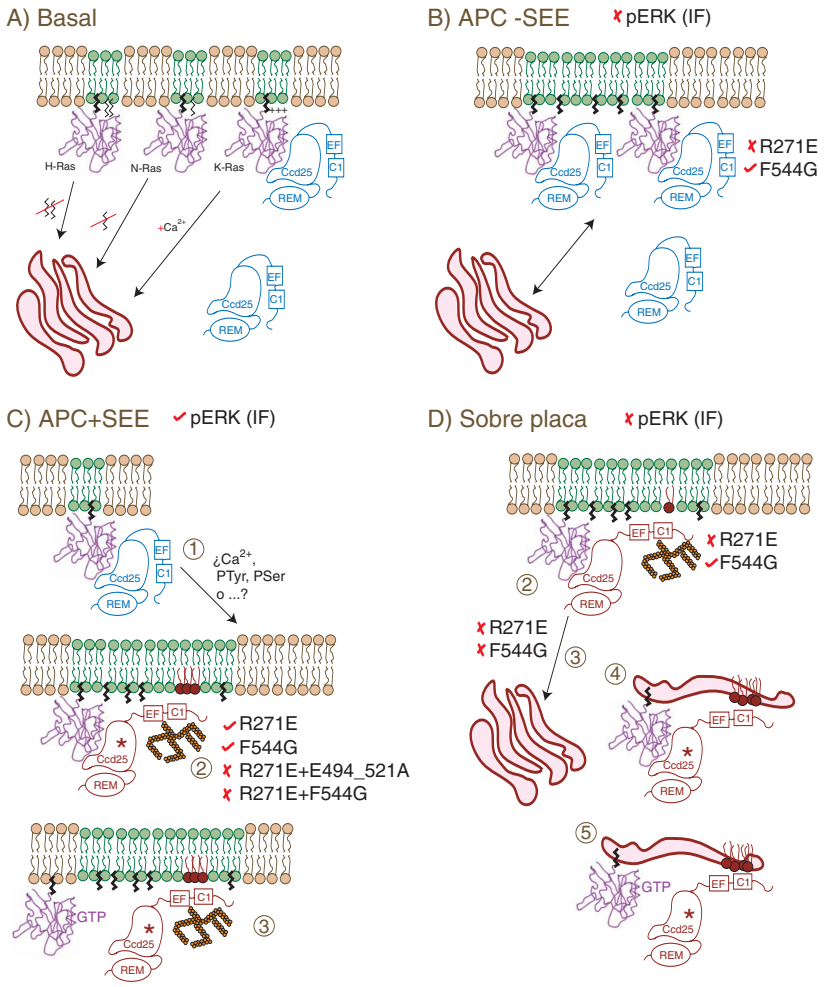


Figura D2 - Modelo de activación de RasGRP1.

A - RasGRP1, en situación basal, interacciona con Ras y se desplaza entre membranas internas y plasmática siguiendo el ciclo habitual de distribución de Ras que depende de la despalmitoilación y repalmitoilación en el caso de H-Ras y N-Ras y del incremento o descenso de Ca^{2+} en K-Ras.

B - En presencia de la célula presentadora (APC) se observa una mayor acumulación de RasGRP1 en membrana como consecuencia de la agrupación de ciertos dominios lipídicos donde se localiza Ras.

C - Cuando la célula presentadora está cargada con superantígeno (SEE) se produce la activación de RasGRP (1) que conlleva su apertura y estabilización en membrana plasmática por la asociación con DAG, generado por PLCγ, y con el citoesqueleto de actina (2); mientras se mantenga el nivel de DAG la proteína se mantiene en esta localización y permite la generación de Ras-GTP (3).

D - En las condiciones en que no hay suficiente DAG en la membrana (estimulación sobre placa) RasGRP aunque con su C1 expuesto no puede unirse y permitir la activación de Ras (2) por lo que se desplaza a membranas internas asociado con Ras (3); en esta nueva ubicación se ancla al DAG de ácidos grasos saturados (4) y como consecuencia permite la generación de Ras-GTP (5).

Se indican las mutaciones generadas sobre Ras y cómo afectan a la localización: ✓, no afecta y ✗, sí afecta. Se muestra también la detección o no de pERK por inmunofluorescencia en función de las condiciones de estimulación. El asterisco que acompaña a algunas de las formas de RasGRP1 indica su estado de máxima activación por anclaje a DAG.

cesen, es decir, se reduzca la cantidad de DAG, la proteína perderá su anclaje a membrana plasmática y probablemente se defosforile escondiendo de nuevo su dominio C1. La recuperación de la conformación inactiva volverá a permitir la interacción estable con Ras y la bajada en los niveles de Ras-GTP.

Si este modelo es cierto y el DAG permite no la translocación de RasGRP1, que está mediada por la interacción con Ras, sino el anclaje a la membrana, en aquellas condiciones en las que se reduzcan los niveles de DAG, RasGRP debería disminuir su localización en membrana plasmática y aumentar su distribución en

endomembranas al desplazarse con Ras y reconocer otras fuentes de DAG, por las que su C1 tiene mayor afinidad. Sin embargo, en presencia de U73122 que reduce los niveles de DAG en membrana plasmática, no observamos ningún cambio en la localización de RasGRP1. En presencia de este inhibidor C1RasGRP1 se deslocaliza lo que demuestra que el DAG de endomembranas también disminuye tras el tratamiento con U73122 lo que impediría la estabilización de RasGRP1 en otras membranas por la falta de DAG. Además, hay que tener en cuenta que la inactividad de PLC probablemente afecte la apertura de la proteína ya que no habrá ni incremento en la concentración de Ca^{2+} ni actividad PKC. En contraste con esta situación, en células Jurkat que no expresan PLCγ1, RasGRP1, en respuesta a la presencia de superantígeno, se distribuye entre membrana plasmática y parcialmente en endomembranas (datos no mostrados), ya que en estas condiciones no se producirá una bajada generalizada de DAG y por lo tanto RasGRP1 podrá ser estabilizada en otras membranas tras ser transportada por Ras y retenida por DAG. En este caso el C1 sí se expondría ya que la actividad PLCγ2 residual de estas células[103] es suficiente para permitir la activación de PKC y el aumento de Ca^{2+}.

Si consideramos, según nuestro modelo, que la localización en membranas internas implica una bajada en los niveles de DAG en la membrana plasmática, esto debería explicar también la distribución dependiente del tiempo que observamos cuando estimulamos sobre placa. En estas condiciones RasGRP1 tras 5 minutos de exposición a los anticuerpos que cubren la superficie de la placa se distribuye en la membrana plasmática para posteriormente desplazarse a membranas internas y permanecer allí al menos durante 60 minutos. Si comprobamos la producción de DAG usando C1bPKCθ como sensor, sólo hay un breve aumento en la membrana plasmática, mientras que la célula se adhiere, y posteriormente hay una clara acumulación en membranas internas. Por lo tanto, en estas circunstancias, encontramos una situación análoga a la de las células PLCγ1$^{-/-}$, al disminuir los niveles de DAG en la membrana plasmática RasGRP1 se desplaza a las membranas internas donde es estabilizado por la interacción con DAG (FigD2). De hecho esta localización interna es dependiente de la presencia de un dominio C1 funcional y de actividad PLC ya que se bloquea con U73122. En concordancia con esta hipótesis, la expresión de un mutante constitutivamente activo de DGKα en esta situación reduce los niveles de DAG en membrana plasmática y provoca la salida de RasGRP1 de esta localización, mientras que el mutante inactivo de DGKα tiene el efecto contrario y la proteína se mantiene durante más tiempo en esta membrana[417].

En estas condiciones de estimulación sobre placa, el mutante incapaz de unir Ras, al no poder ser transportado no podrá alcanzar la membranas internas para poder estabilizarse y como en la membrana plasmática no habrá suficiente DAG como para retenerlo, lo observamos en el citosol. Sin embargo, resulta significativo que el mutante de unión a Ras no localice parcialmente en la membranas internas ya que es capaz de reconocer el DAG y una cierta proporción de la proteína, al mantener la conformación activa, podría asociarse al que se acumula de forma permanente en endomembranas. La explicación más razonable en esta situación es que el mutante de unión a Ras, que se ha comprobado que actúa como dominante negativo[40,367], puede afectar la activación de proteínas como PKCε[247] o PLD1[520,531] que se regulan por Ras y localizan en estructuras internas[141,224,247,449] donde conducen a la producción de DAG. Hasta ahora se desconoce qué tipo de DAG podría generar PKCε en estas localizaciones pero probablemente sí juega algún papel en mantener los niveles de DAG en membranas internas como demuestra el efecto de U73122 en la localización de C1RasGRP1. En el caso de PLD1, su actividad combinada con PAP va a permitir obtener DAG con ácidos grasos saturados ya que en presencia de propranolol, el inhibidor de PAP, C1RasGRP1 pierde su localización. En células Jurkat la expresión de PLD1 es casi inexistente por lo que quizás la PLD implicada en estos procesos pueda ser PLD2[268], la activada por oleato[240,364] u otra de las que se han podido describir por ensayos bioquímicos pero que todavía no han sido clonadas y se desconoce cómo se regulan[457].

La primera descripción de RasGRP1 en la respuesta a la estimulación del TCR también situaba a la enzima en localizaciones internas[40,369]. Si consideramos esta activación en el contexto de nuestro modelo parece ajustarse, ya que la estimulación en estos casos se realiza con anticuerpos a una concentración muy baja lo que supone una activación limitada de PLCγ y como consecuencia un leve incremento de DAG en la membrana plasmática suficiente, probablemente, para permitir la activación de PKCθ y la consiguiente fosforilación y apertura de RasGRP1 pero no para su anclaje a la membrana plasmática.

En conclusión, nuestro modelo establece que RasGRP1, una vez activada y expuesto su dominio C1 probablemente como consecuencia de la fosforilación, se mantiene en un equilibrio entre membrana plasmática e internas en función de la concentración de DAG, favoreciéndose la localización en membrana plasmática a pesar de la elevada afinidad por DAG de endomembranas, por la asociación con el citoesqueleto de actina. Es importante destacar que la interacción con el DAG no es sólo necesaria para definir la localización sino que también lo es para estabilizar la asociación con la membrana cuando la proteína es activa; en ese momento RasGRP1 es incapaz de unirse de forma estable a Ras ya que se comporta como un GEF y debe liberar con la mayor celeridad posible la molécula de Ras-GTP para asociar otra de Ras-GDP y conducir así al incremento de Ras-GTP característico de la estimulación.

Implicación del Modelo de Activación de RASGRP1 en su Función

Nuestros experimentos demuestran que tanto la expresión del tándem C1a+C1bPKCθ, que localiza en membrana plasmática, como del dominio C1 de RasGRP1, que se distribuye en estructuras internas, modifica la cinética de fosforilación de ERK en respuesta a la estimulación del TCR con anticuerpos αCD3+αCD28 solubles. Esto sugiere la activación de RasGRP1 endógeno en el aparato de Golgi o en el RE. Sin embargo, aunque se ha descrito la presencia de Ras-GTP en endomembranas[40,369], posiblemente el cambio que detectamos en pERK en presencia de C1RasGRP1 no implica un bloqueo de la activación de Ras en esta localización. En principio la activación de la vía de Raf inducida por Ras se produce en el contexto de la membrana plasmática[174] y además, en las condiciones que RasGRP está asociada con membranas internas somos incapaces de detectar un aumento de pERK, por inmunofluorescencia, en esta localización (datos no mostrados). En apoyo de esta observación recientemente se ha publicado que la cantidad de Ras-GTP endógeno en membranas internas de células Jurkat es indetectable con un nuevo sensor, que por primera vez, reconoce la señal de Ras-GTP sin necesidad de su sobre-expresión[22].

La cinética de activación de ERK observada en presencia de C1RasGRP1 se carateriza, en comparación con el control, por un aumento en su fosforilación a 15 minutos y un bloqueo a tiempos posteriores. Esta diferencia podría deberse, según nuestro modelo, a una alteración en el equilibrio que mantiene a la proteína silvestre repartida entre endomembranas y membrana plasmática. La sobre-expresión de C1RasGRP1 bloquea el DAG de las membranas internas, desplazando a RasGRP1 que vuelve entonces a la membrana plasmática. En esta localización, a 15 minutos, todavía hay suficiente DAG acumulado como para permitir su anclaje y el consiguiente aumento de Ras-GTP y pERK. Sin embargo a los 30, 60 y 120 minutos el nivel de DAG en la membrana plasmática es menor y al haber más RasGRP1 sólo un pequeño porcentaje podrá ser activado. El resto, que no puede catalizar el intercambio GDP/GTP y permanece unido de forma estable a Ras, disminuye la cantidad de éste disponible para ser activado y como consecuencia, observamos la bajada de pERK.

Aunque nuestros datos demuestran que RasGRP1 puede interaccionar de forma estable con Ras todavía no sabemos cual de las tres formas de Ras es la que participa en esta unión. En cuanto a la carga con GTP de Ras, RasGRP1 es capaz de promover in vitro el intercambio de GDP por GTP en las tres formas de Ras[479] pero sin embargo el único estudio realizado in vivo describe que en células Jurkat y en condiciones de estimulación leves, la forma de Ras que se activa es N-Ras[369]. La única información de la que nosotros disponemos indica que la forma o formas de Ras que se activan dependiendo de actividad PLC y por lo tanto, en parte, de RasGRP1 son capaces de inducir la activación de la vía de Raf/MEK/ERK y la de Ral pero no la de PI3K. No obstante, no podemos olvidar que hay otras rutas reguladas por DAG implicadas en la modulación de Ras. Los linfocitos T expresan ciertos niveles de RasGRP3[475] que puede participar en la activación de Ras y sus efectores ya que no sólo es capaz de activar Ras[356] sino también Rap[383] que en muchos aspectos se comporta como un antagonista de Ras al compartir algunos de sus efectores y en determinadas condiciones secuestrarlos[67,193,561]. Otras de las proteínas cuya actividad se regula por DAG y que han sido implicadas en la activación de Ras son alguna de las formas de PKC que en principio podrían controlar la actividad de algún GAP de Ras[109,214], modular la actividad de Raf una vez que se asocia con Ras-GTP en la membrana[312] o como hemos discutido forforilar RasGRP1 permitiendo su activación y por lo tanto un incremento en los niveles de RasGTP. Otra posible vía, que hasta ahora sólo se ha implicado en la activación de Ras por EGF, es la fosforilación de Rin por PKD; Rin compite con Raf por el sitio de unión en Ras-GTP y cuando se fosforila se asocia con 14.3.3 liberando a Ras para que pueda unir Raf y continuar la cascada de señalización[518].

En el timo de los ratones KO para RasGRP1 la selección positiva está bloqueada[108,269] lo que correlaciona con el fenotipo de los ratones en que se bloquea la señalización de Ras ya sea con el uso de un dominante negativo de H-Ras[465] o Raf[350], un mutante inactivo de MEK[7,132] o mutantes de la cadena α del TCR[522] o δCD3[99] incapaces de activar la vía Ras/Raf/MEK/ERK. Esto indica que en las células DP en las que RasGRP1 comienza a expresarse y alcanza su máximo en comparación con los estadios de SP[349], esta proteína es esencial para la activación de ERK. En los ratones KO la selección negativa no parece estar alterada y sin embargo en la edad adulta los ratones desarrollan una enfermedad autoinmune porque algunas de las poblaciones de linfocitos T que abandonan el timo no han sido debidamente seleccionadas y permiten la activación de células B que generan auto-anticuerpos[269]. En este sentido, trabajos más recientes han relacionado la activación de ERK también con la selección negativa y han definido la capacidad de ERK en función de su grado de activación y el tiempo que permanece en este estado de permitir a la célula DP distinguir entre selección positiva o negativa[41,314]. Teniendo en cuenta que, según nuestro modelo, la activación de RasGRP1 en la membrana plasmática y en consecuencia la generación de Ras-GTP y la fosforilación de ERK depende de la intensidad de la señal y de la producción de DAG, RasGRP1 es un perfecto

candidato que puede regular la activación de ERK en función de la intensidad de la señal. Esto explicaría porque los ratones KO desarrollan autoinmunidad ya que RasGRP1 además de absolutamente necesaria para la activación de ERK, que posibilita la selección positiva, permite definir su cinética de activación que, aunque no es clave para la selección negativa, sí puede modularla.

Las características estructurales de RasGRP1 confieren a esta proteína las propiedades que le permiten modular la intensidad de la activación de Ras y así distinguir entre diferenciación y muerte celular. Este sistema de regulación no es exclusivo de linfocitos ya que en las células nerviosas, el otro tipo celular donde, de forma exclusiva, se expresan los miembros de la familia RasGRP, la intensidad de la activación de Ras también permite discernir entre proliferación y diferenciación[90,93,317]. Además, esta función de RasGRP podría haberse conservado evolutivamente ya que en *C. elegans* la desaparición del ortólogo de RasGRP, usando técnicas de ARN de interferencia, provoca una alteración en el número de vulvas que se generan y la especificación de las células para generar vulva también es dependiente de los niveles de activación de Ras[116].

Otro aspecto en que RasGRP1 puede ser importante es la inducción de la proliferación por IL2 porque los linfocitos T de los ratones KO que alcanzan la periferia, a pesar de expresar CD25 en superficie no proliferan correctamente en presencia de IL2 exógena[269]. Esta deficiencia sin embargo no provoca un bloqueo total de la división de las células[374] probablemente porque en periferia y en respuesta a IL2 también se activa la vía de Grb2/Sos[144,336] que conduce a la activación de Ras[283] y puede compensar parcialmente la ausencia de RasGRP1. Hay que destacar que en la señalización por IL2 no hay una actividad PLC[341] asociada con el receptor por lo que en ausencia de una fuente de DAG en la membrana plasmática, RasGRP1, al activarse, podría localizar en membranas internas donde la presencia de Ras-GTP podría actuar sobre otras proteínas efectoras distintas a la cascada de Raf/MEK/ERK.

Otro de los fenómenos en los que se regula la actividad de Ras es durante la anergia. Las células anérgicas en respuesta a una nueva estimulación son incapaces de generar Ras-GTP a pesar de que la vía de Sos no parece estar alterada[134]. Sin embargo, la fosforilación de ERK se recupera si se estimula con PMA e ionomicina[284]. Estos datos sugieren una participación de alguna de las formas de RasGRP en estas condiciones por lo que podemos hipotetizar que cuando la célula es anérgica y aumentan los niveles de expresión de DGKα, como se ha descrito[308], el consiguiente descenso de los niveles de DAG modificará el estado de activación de RasGRP y en consecuencia la cantidad de Ras-GTP. Cuando se añade PMA e ionomicina RasGRP1 se estimula independiente del incremento de la actividad DGK y por lo tanto se recupera la señal de pERK[284].

Finalmente no podemos olvidar la capacidad de RasGRP1 de inducir linfomas cuando se sobre-expresa en ratones mediante transgénesis. Esta inducción no requiere una señal previa de activación y sólo depende de la presencia de un exceso de proteína[256]. De hecho, nuestros datos demuestran que la simple expresión de GFPRasGRP1 en células Jurkat provoca un aumento de Ras-GTP. Este incremento no se altera en presencia de U73122 por lo que debe depender simplemente de la asociación constitutiva con Ras que permitirá una activación parcial de Ras con el consiguiente incremento en los niveles de Ras-GTP.

CONCLUSIONES

A) Determinadas isoformas de DGK, modulando los niveles de DAG y/o generando PA, son importantes en la regulación de respuestas celulares. La sobreexpresión de DGKα modula diferentes procesos:

1 - En linfocitos, colabora en la activación de PI3K durante la proliferación dependiente de IL2

2 - En células endoteliales modifica la dinámica del citoesqueleto de actina pero no la adhesión al sustrato y en consecuencia, altera el crecimiento, inducido por PDGF, de los lamelipodios

B) La generación de dominios C1 fusionados a GFP permite estudiar la cinética de producción y degradación de DAG e interferir con señales mediadas por este lípido:

3 - Los dominios C1, dependiendo de su secuencia primaria, plegamiento y combinación en tándem son capaces de diferenciar distintas especies de DAG y, como consecuencia, localizan en distintas membranas celulares y responden o no al incremento de DAG inducido por la estimulación del TCR.

4 - La localización subcelular de C1a+C1bPKCθ y C1RasGRP1, en membrana plasmática o endomembranas, respectivamente, altera la cinética de activación de la vía de Ras/Raf/MEK/ERK al secuestrar el DAG presente en estas membranas.

C) La presencia de un dominio C1 conservado condiciona el mecanismo de activación de RasGRP1 en linfocitos.

5 - La localización subcelular de RasGRP1, en respuesta a la estimulación del TCR, depende de al menos tres factores: de la interacción con Ras, de la presencia de un dominio C1 capaz de detectar DAG y de unas manos de Ca^{2+} funcionales.

6 - La interacción de RasGRP1 con Ras permite establecer un equilibrio en términos de localización entre membrana plasmática y endomembranas. El desplazamiento hacia un extremo u otro del equilibrio depende de los niveles de DAG en las distintas localizaciones y de la exposición del dominio C1 de RasGRP1.

7 - La presencia de DAG es necesaria para la activación de RasGRP1. El DAG no sólo permite la estabilización de la conformación activa de la proteína sino que también es necesario para mantener a RasGRP1 asociado a la membrana cuando, a consecuencia del incremento de su actividad GEF, es incapaz de unir Ras de forma estable.

BIBLIOGRAFÍA

1 **Abe, T., Lu, X., Jiang, Y., Boccone, C.E., Qian, S., Vattem, K.M., Wek, R.C. and Walsh, J.P.** (2003) Site-directed mutagenesis of the active site of diacylglycerol kinase alpha: calcium and phosphatidylserine stimulate enzyme activity via distinct mechanisms. *Biochem J* 375 (Pt 3), 673-680

2 **Abeliovich, A., Paylor, R., Chen, C., Kim, J.J., Wehner, J.M. and Tonegawa, S.** (1993) PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. *Cell* 75 (7), 1263-1271

3 **Abramovici, H., Hogan, A.B., Obagi, C., Topham, M.K. and Gee, S.H.** (2003) Diacylglycerol kinase-zeta localization in skeletal muscle is regulated by phosphorylation and interaction with syntrophins. *Mol Biol Cell* 14 (11), 4499-4511

4 **Ahmed, S., Kozma, R., Monfries, C., Hall, C., Lim, H.H., Smith, P. and Lim, L.** (1990) Human brain n-chimaerin cDNA encodes a novel phorbol ester receptor. *Biochem J* 272 (3), 767-773

5 **Ahmed, S., Lee, J., Kozma, R., Best, A., Monfries, C. and Lim, L.** (1993) A novel functional target for tumor-promoting phorbol esters and lysophosphatidic acid. The p21rac-GTPase activating protein n-chimaerin. *J Biol Chem* 268 (15), 10709-10712

6 **Aiba, Y., Oh-hora, M., Kiyonaka, S., Kimura, Y., Hijikata, A., Mori, Y. and Kurosaki, T.** (2004) Activation of RasGRP3 by phosphorylation of Thr-133 is required for B cell receptor-mediated Ras activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (47), 16612-16617

7 **Alberola-Ila, J., Forbush, K.A., Seger, R., Krebs, E.G. and Perlmutter, R.M.** (1995) Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* 373 (6515), 620-623

8 **Albert, A.P., Piper, A.S. and Large, W.A.** (2005) Role of phospholipase D and diacylglycerol in activating constitutive TRPC-like cation channels in rabbit ear artery myocytes. *J Physiol* 566 (Pt 3), 769-780

9 **Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. and Hemmings, B.A.** (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J* 15 (23), 6541-6551

10 **Ali, H., Nakano, T., Saino-Saito, S., Hozumi, Y., Katagiri, Y., Kamii, H., Sato, S., Kayama, T., Kondo, H. and Goto, K.** (2004) Selective translocation of diacylglycerol kinase zeta in hippocampal neurons under transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett* 372 (3), 190-195

11 **Allen, V., Swigart, P., Cheung, R., Cockcroft, S. and Katan, M.** (1997) Regulation of inositol lipid-specific phospholipase cdelta by changes in Ca2+ ion concentrations. *Biochem J* 327 (Pt 2), 545-552

12 **Alonso, R., Rodriguez, M.C., Pindado, J., Merino, E., Merida, I. and Izquierdo, M.** (2005) Diacylglycerol kinase alpha regulates the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes. *J Biol Chem* 280 (31), 28439-28450

13 **Ananthanarayanan, B., Stahelin, R.V., Digman, M.A. and Cho, W.** (2003) Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are determined by the ligand affinity and conformational flexibility of their C1 domains. *J Biol Chem* 278 (47), 46886-46894

14 **Anderson, G., Chen, J. and Wang, Q.J.** (2005) Individual C1 domains of PKD3 in phorbol ester-induced plasma membrane translocation of PKD3 in intact cells. *Cell Signal* 17 (11), 1397-1411

15 **Antonny, B., Huber, I., Paris, S., Chabre, M. and Cassel, D.** (1997) Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J Biol Chem* 272 (49), 30848-30851

16 **Apolloni, A., Prior, I.A., Lindsay, M., Parton, R.G. and Hancock, J.F.** (2000) H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol* 20 (7), 2475-2487

17 **Arnold, R.S., DePaoli-Roach, A.A. and Cornell, R.B.** (1997) Binding of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase to lipid vesicles: diacylglycerol and enzyme dephosphorylation increase the affinity for negatively charged membranes. *Biochemistry* 36 (20), 6149-6156

18 **Ashery, U., Varoqueaux, F., Voets, T., Betz, A., Thakur, P., Koch, H., Neher, E., Brose, N. and Rettig, J.** (2000) Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *Embo J* 19 (14), 3586-3596

19 **Athenstaedt, K. and Daum, G.** (1999) Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *Eur J Biochem* 266 (1), 1-16

20 **Attard, G.S., Templer, R.H., Smith, W.S., Hunt, A.N. and Jackowski, S.** (2000) Modulation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase by membrane curvature elastic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (16), 9032-9036

21 **Auer, A., von Blume, J., Sturany, S., von Wichert, G., Van Lint, J., Vandenheede, J., Adler, G. and Seufferlein, T.** (2005) Role of the regulatory domain of protein kinase D2 in phorbol ester binding, catalytic activity, and nucleocytoplasmic shuttling. *Mol Biol Cell* 16 (9), 4375-4385

22 **Augsten, M., Pusch, R., Biskup, C., Rennert, K., Wittig, U., Beyer, K., Blume, A., Wetzker, R., Friedrich, K. and Rubio, I.** (2005) Live-cell imaging of endogenous Ras-GTP illustrates predominant Ras activation at the plasma membrane. *EMBO Rep*

23 **Augustin, I., Rosenmund, C., Sudhof, T.C. and Brose, N.** (1999) Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400 (6743), 457-461

24 **Augustin, I., Korte, S., Rickmann, M., Kretzschmar, H.A., Sudhof, T.C., Herms, J.W. and Brose, N.** (2001) The cerebellum-specific Munc13 isoform Munc13-3 regulates cerebellar synaptic transmission and motor learning in mice. *J Neurosci* 21 (1), 10-17

25 **Avila-Flores, A., Santos, T., Rincon, E. and Merida, I.** (2005) Modulation of the mammalian target of rapamycin pathway by diacylglycerol kinase-produced phosphatidic acid. *J Biol Chem* 280 (11), 10091-10099

26 **Bacchiocchi, R., Baldanzi, G., Carbonari, D., Capomagi, C., Colombo, E., van Blitterswijk, W.J., Graziani, A. and Fazioli, F.** (2005) Activation of alpha-diacylglycerol kinase is critical for the mitogenic properties of anaplastic lymphoma kinase. *Blood* 106 (6), 2175-2182

27 **Bai, J. and Pagano, R.E.** (1997) Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of BODIPY-labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry* 36 (29), 8840-8848

28 **Baldanzi, G., Mitola, S., Cutrupi, S., Filigheddu, N., van Blitterswijk, W.J., Sinigaglia, F., Bussolino, F. and Graziani, A.** (2004) Activation of diacylglycerol kinase alpha is required for VEGF-induced angiogenic signaling in vitro. *Oncogene* 23 (28), 4828-4838

29 **Baron, C.L. and Malhotra, V.** (2002) Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science* 295 (5553), 325-328

30 **Basu, J., Shen, N., Dulubova, I., Lu, J., Guan, R., Guryev, O., Grishin, N.V., Rosenmund, C. and Rizo, J.** (2005) A minimal domain responsible for Munc13 activity. *Nat Struct Mol Biol*

31 **Batista, E.L., Jr., Warbington, M., Badwey, J.A. and Van Dyke, T.E.** (2005) Differentiation of HL-60 cells to granulocytes involves regulation of select diacylglycerol kinases (DGKs). *J Cell Biochem* 94 (4), 774-793

32 **Bazzi, M.D. and Nelsestuen, G.L.** (1988) Properties of membrane-inserted protein kinase C. *Biochemistry* 27 (20), 7589-7593

33 **Bell, R.L., Kennerly, D.A., Stanford, N. and Majerus, P.W.** (1979) Diglyceride lipase: a pathway for arachidonate release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (7), 3238-3241

34 **Betz, A., Okamoto, M., Benseler, F. and Brose, N.** (1997) Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *J Biol Chem* 272 (4), 2520-2526

35 **Betz, A., Ashery, U., Rickmann, M., Augustin, I., Neher, E., Sudhof, T.C., Rettig, J. and Brose, N.** (1998) Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron* 21 (1), 123-136

36 **Betz, A., Thakur, P., Junge, H.J., Ashery, U., Rhee, J.S., Scheuss, V., Rosenmund, C., Rettig, J. and Brose, N.** (2001) Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. *Neuron* 30 (1), 183-196

37 **Bi, K., Roth, M.G. and Ktistakis, N.T.** (1997) Phosphatidic acid formation by phospholipase D is required for transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Curr Biol* 7 (5), 301-307

38 **Bishop, A.L. and Hall, A.** (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2, 241-255

39 **Bittova, L., Stahelin, R.V. and Cho, W.** (2001) Roles of ionic residues of the C1 domain in protein kinase C-alpha activation and the origin of phosphatidylserine specificity. *J Biol Chem* 276 (6), 4218-4226

40 **Bivona, T.G., Perez De Castro, I., Ahearn, I.M., Grana, T.M., Chiu, V.K., Lockyer, P.J., Cullen, P.J., Pellicer, A., Cox, A.D. and Philips, M.R.** (2003) Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature* 424 (6949), 694-698

41 **Bommhardt, U., Scheuring, Y., Bickel, C., Zamoyska, R. and Hunig, T.** (2000) MEK activity regulates negative selection of immature CD4+CD8+ thymocytes. *J Immunol* 164 (5), 2326-2337

42 **Booden, M.A., Campbell, S.L. and Der, C.J.** (2002) Critical but distinct roles for the pleckstrin homology and cysteine-rich domains as positive modulators of Vav2 signaling and transformation. *Mol Cell Biol* 22 (8), 2487-2497

43 **Boriack-Sjodin, P.A., Margarit, S.M., Bar-Sagi, D. and Kuriyan, J.** (1998) The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 394 (6691), 337-343

44 **Bowden, E.T., Barth, M., Thomas, D., Glazer, R.I. and Mueller, S.C.** (1999) An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene* 18 (31), 4440-4449

45 **Brandlin, I., Eiseler, T., Salowsky, R. and Johannes, F.J.** (2002) Protein kinase C(mu) regulation of the JNK pathway is triggered via phosphoinositide-dependent kinase 1 and protein kinase C(epsilon). *J Biol Chem* 277 (47), 45451-45457

46 **Brandlin, I., Hubner, S., Eiseler, T., Martinez-Moya, M., Horschinek, A., Hausser, A., Link, G., Rupp, S., Storz, P., Pfizenmaier, K. and Johannes, F.J.** (2002) Protein kinase C (PKC)eta-mediated PKC mu activation modulates ERK and JNK signal pathways. *J Biol Chem* 277 (8), 6490-6496

47 **Bregoli, L., Baldassare, J.J. and Raben, D.M.** (2001) Nuclear diacylglycerol kinase-theta is activated in response to alpha-thrombin. *J Biol Chem* 276 (26), 23288-23295

48 **Brindley, D.N., English, D., Pilquil, C., Buri, K. and Ling, Z.C.** (2002) Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. *Biochim Biophys Acta* 1582 (1-3), 33-44

49 **Brodie, C., Steinhart, R., Kazimirsky, G., Rubinfeld, H., Hyman, T., Ayres, J.N., Hur, G.M., Toth, A., Yang, D., Garfield, S.H., Stone, J.C. and Blumberg, P.M.** (2004) PKCdelta associates with and is involved in the phosphorylation of RasGRP3 in response to phorbol esters. *Mol Pharmacol* 66 (1), 76-84

50 **Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y. and Sudhof, T.C.** (1995) Mammalian homologues of Caenorhabditis elegans unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *J Biol Chem* 270 (42), 25273-25280

51 **Brose, N. and Rosenmund, C.** (2002) Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci* 115 (Pt 23), 4399-4411

52 **Brose, N., Betz, A. and Wegmeyer, H.** (2004) Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals. *Curr Opin Neurobiol* 14 (3), 328-340

53 **Brown, H.A., Gutowski, S., Moomaw, C.R., Slaughter, C. and Sternweis, P.C.** (1993) ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* 75 (6), 1137-1144

54 **Brown, M., Jacobs, T., Eickholt, B., Ferrari, G., Teo, M., Monfries, C., Qi, R.Z., Leung, T., Lim, L. and Hall, C.** (2004) Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse. *J Neurosci* 24 (41), 8994-9004

55 **Bunting, M., Tang, W., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. and Prescott, S.M.** (1996) Molecular cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem* 271 (17), 10230-10236

56 **Burch, R.M.** (1988) Diacylglycerol stimulates phospholipase A2 from Swiss 3T3 fibroblasts. *FEBS Lett* 234 (2), 283-286

57 **Burger, K.N.** (2000) Greasing membrane fusion and fission machineries. *Traffic* 1 (8), 605-613

58 **Burns, D.J. and Bell, R.M.** (1991) Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *J Biol Chem* 266 (27), 18330-18338

59 **Cabrera-Poch, N., Sanchez-Ruiloba, L., Rodriguez-Martinez, M. and Iglesias, T.** (2004) Lipid raft disruption triggers protein kinase C and Src-dependent protein kinase D activation and Kidins220 phosphorylation in neuronal cells. *J Biol Chem* 279 (27), 28592-28602

60 **Caloca, M.J., Fernandez, N., Lewin, N.E., Ching, D., Modali, R., Blumberg, P.M. and Kazanietz, M.G.** (1997) Beta2-chimaerin is a high affinity receptor for the phorbol ester tumor promoters. *J Biol Chem* 272 (42), 26488-26496

61 **Caloca, M.J., Wang, H. and Kazanietz, M.G.** (2003) Characterization of the Rac-GAP (Rac-GTPase-activating protein) activity of beta2-chimaerin, a 'non-protein kinase C' phorbol ester receptor. *Biochem J* 375 (Pt 2), 313-321

62 **Caloca, M.J., Zugaza, J.L. and Bustelo, X.R.** (2003) Exchange factors of the RasGRP family mediate Ras activation in the Golgi. *J Biol Chem* 278 (35), 33465-33473

63 **Caloca, M.J., Zugaza, J.L., Matallanas, D., Crespo, P. and Bustelo, X.R.** (2003) Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor Ras GRP1. *Embo J* 22 (13), 3326-3336

64 **Caloca, M.J., Zugaza, J.L., Vicente-Manzanares, M., Sanchez-Madrid, F. and Bustelo, X.R.** (2004) F-actin-dependent translocation of the Rap1 GDP/GTP exchange factor RasGRP2. *J Biol Chem* 279 (19), 20435-20446

65 **Canagarajah, B., Leskow, F.C., Ho, J.Y., Mischak, H., Saidi, L.F., Kazanietz, M.G. and Hurley, J.H.** (2004) Structural mechanism for lipid activation of the Rac-specific GAP, beta2-chimaerin. *Cell* 119 (3), 407-418

66 **Cantrell, D.A.** (2002) Transgenic analysis of thymocyte signal transduction. *Nat Rev Immunol* 2 (1), 20-27

67 **Carey, K.D., Dillon, T.J., Schmitt, J.M., Baird, A.M., Holdorf, A.D., Straus, D.B., Shaw, A.S. and Stork, P.J.** (2000) CD28 and the tyrosine kinase lck stimulate mitogen-activated protein kinase activity in T cells via inhibition of the small G protein Rap1. *Mol Cell Biol* 20 (22), 8409-8419

68 **Caricasole, A., Bettini, E., Sala, C., Roncarati, R., Kobayashi, N., Caldara, F., Goto, K. and Terstappen, G.C.** (2002) Molecular cloning and characterization of the human diacylglycerol kinase beta (DGKbeta) gene: alternative splicing generates DGKbeta isotypes with different properties. *J Biol Chem* 277 (7), 4790-4796

69 **Castrillo, A., Pennington, D.J., Otto, F., Parker, P.J., Owen, M.J. and Bosca, L.** (2001) Protein kinase Cepsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *J Exp Med* 194 (9), 1231-1242

70 **Chakrabarti, R. and Kumar, S.** (2000) Diacylglycerol mediates the T-cell receptor-driven Ca(2+) influx in T cells by a novel mechanism independent of protein kinase C activation. *J Cell Biochem* 78 (2), 222-230

71 **Chen, J.S. and Exton, J.H.** (2004) Regulation of phospholipase D2 activity by protein kinase C alpha. *J Biol Chem* 279 (21), 22076-22083

72 **Chen, Y., Zheng, Y. and Foster, D.A.** (2003) Phospholipase D confers rapamycin resistance in human breast cancer cells. *Oncogene* 22 (25), 3937-3942

73 **Cheng, K.H. and Hui, S.W.** (1986) Correlation between bilayer destabilization and activity enhancement by diacylglycerols in reconstituted Ca-ATPase vesicles. *Arch Biochem Biophys* 244 (1), 382-386

74 **Ching, T.T., Wang, D.S., Hsu, A.L., Lu, P.J. and Chen, C.S.** (1999) Identification of multiple phosphoinositide-specific phospholipases D as new regulatory enzymes for phosphatidylinositol 3,4, 5-trisphosphate. *J Biol Chem* 274 (13), 8611-8617

75 **Choi, D.S., Wang, D., Dadgar, J., Chang, W.S. and Messing, R.O.** (2002) Conditional rescue of protein kinase C epsilon regulates ethanol preference and hypnotic sensitivity in adult mice. *J Neurosci* 22 (22), 9905-9911

76 **Choy, E., Chiu, V.K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I.E. and Philips, M.R.** (1999) Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98 (1), 69-80

77 **Chung, C.Y., Funamoto, S. and Firtel, R.A.** (2001) Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem Sci* 26 (9), 557-566

78 **Cipres, A., Gala, S., Martinez, A.C., Merida, I. and Williamson, P.** (1999) An IL-2 receptor beta subdomain that controls Bcl-X(L) expression and cell survival. *Eur J Immunol* 29 (4), 1158-1167

79 **Cipres, A., Carrasco, S. and Merida, I.** (2001) Deletion of the acidic-rich domain of the IL-2Rbeta chain increases receptor-associated PI3K activity. *FEBS Lett* 500 (1-2), 99-104

80 **Cipres, A., Carrasco, S., Merino, E., Diaz, E., Krishna, U.M., Falck, J.R., Martinez, A.C. and Merida, I.** (2003) Regulation of diacylglycerol kinase alpha by phosphoinositide 3-kinase lipid products. *J Biol Chem* 278 (37), 35629-35635

81 **Clark, G.J., Drugan, J.K., Rossman, K.L., Carpenter, J.W., Rogers-Graham, K., Fu, H., Der, C.J. and Campbell, S.L.** (1997) 14-3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. *J Biol Chem* 272 (34), 20990-20993

82 **Clyde-Smith, J., Silins, G., Gartside, M., Grimmond, S., Etheridge, M., Apolloni, A., Hayward, N. and Hancock, J.F.** (2000) Characterization of RasGRP2, a plasma membrane-targeted, dual specificity Ras/Rap exchange factor. *J Biol Chem* 275 (41), 32260-32267

83 **Cockcroft, S.** (1998) Phosphatidylinositol transfer proteins: a requirement in signal transduction and vesicle traffic. *Bioessays* 20 (5), 423-432

84 **Cockcroft, S.** (2001) Signalling roles of mammalian phospholipase D1 and D2. *Cell Mol Life Sci* 58 (11), 1674-1687

85 **Colley, W.C., Sung, T.C., Roll, R., Jenco, J., Hammond, S.M., Altshuller, Y., Bar-Sagi, D., Morris, A.J. and Frohman, M.A.** (1997) Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol* 7 (3), 191-201

86 **Coppola, J., Bryant, S., Koda, T., Conway, D. and Barbacid, M.** (1991) Mechanism of activation of the vav protooncogene. *Cell Growth Differ* 2 (2), 95-105

87 **Corbalan-Garcia, S., Rodriguez-Alfaro, J.A. and Gomez-Fernandez, J.C.** (1999) Determination of the calcium-binding sites of the C2 domain of protein kinase Calpha that are critical for its translocation to the plasma membrane. *Biochem J* 337 (Pt 3), 513-521

88 **Costello, P.S., Gallagher, M. and Cantrell, D.A.** (2002) Sustained and dynamic inositol lipid metabolism inside and outside the immunological synapse. *Nat Immunol* 3 (11), 1082-1089

89 **Coughlin, J.J., Stang, S.L., Dower, N.A. and Stone, J.C.** (2005) RasGRP1 and RasGRP3 Regulate B Cell Proliferation by Facilitating B Cell Receptor-Ras Signaling. *J Immunol* 175 (11), 7179-7184

90 **Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. and Marshall, C.J.** (1994) Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77 (6), 841-852

91 **Crittenden, J.R., Bergmeier, W., Zhang, Y., Piffath, C.L., Liang, Y., Wagner, D.D., Housman, D.E. and Graybiel, A.M.** (2004) CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat Med* 10 (9), 982-986

92 **Cross, M.J., Roberts, S., Ridley, A.J., Hodgkin, M.N., Stewart, A., Claesson-Welsh, L. and Wakelam, M.J.** (1996) Stimulation of actin stress fibre formation mediated by activation of phospholipase D. *Curr Biol* 6 (5), 588-597

93 **Cullen, P.J. and Lockyer, P.J.** (2002) Integration of calcium and Ras signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (5), 339-348

94 **Cutrupi, S., Baldanzi, G., Gramaglia, D., Maffe, A., Schaap, D., Giraudo, E., van Blitterswijk, W., Bussolino, F., Comoglio, P.M. and Graziani, A.** (2000) Src-mediated activation of alpha-diacylglycerol kinase is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility. *Embo J* 19 (17), 4614-4622

95 **Das, S. and Rand, R.P.** (1984) Diacylglycerol causes major structural transitions in phospholipid bilayer membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 124 (2), 491-496

96 **Das, S. and Rand, R.P.** (1986) Modification by diacylglycerol of the structure and interaction of various phospholipid bilayer membranes. *Biochemistry* 25 (10), 2882-2889

97 **Das, S., Dixon, J.E. and Cho, W.** (2003) Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (13), 7491-7496

98 **Davidson, L., Pawson, A.J., De Maturana, R.L., Freestone, S.H., Barran, P., Millar, R.P. and Maudsley, S.** (2004) Gonadotropin-releasing hormone-induced activation of diacylglycerol kinase-zeta and its association with active c-src. *J Biol Chem* 279 (12), 11906-11916

99 **Delgado, P., Fernandez, E., Dave, V., Kappes, D. and Alarcon, B.** (2000) CD3delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection. *Nature* 406 (6794), 426-430

100 **Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A. and Messing, R.O.** (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279 (3), L429-438

101 **Depoil, D., Zaru, R., Guiraud, M., Chauveau, A., Harriague, J., Bismuth, G., Utzny, C., Muller, S. and Valitutti, S.** (2005) Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization. *Immunity* 22 (2), 185-194

102 **Diaz Anel, A.M. and Malhotra, V.** (2005) PKCeta is required for beta1gamma2/beta3gamma2- and PKD-mediated transport to the cell surface and the organization of the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 169 (1), 83-91

103 **Diaz-Flores, E., Siliceo, M., Martinez, A.C. and Merida, I.** (2003) Membrane translocation of protein kinase Ctheta during T lymphocyte activation

requires phospholipase C-gamma-generated diacylglycerol. *J Biol Chem* 278 (31), 29208-29215

104 **Ding, L., Bunting, M., Topham, M.K., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A. and Prescott, S.M.** (1997) Alternative splicing of the human diacylglycerol kinase zeta gene in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (11), 5519-5524

105 **Ding, L., Traer, E., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A. and Prescott, S.M.** (1998) The cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase, DGKiota. *J Biol Chem* 273 (49), 32746-32752

106 **Distler, J.H., Hirth, A., Kurowska-Stolarska, M., Gay, R.E., Gay, S. and Distler, O.** (2003) Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 47 (3), 149-161

107 **Dong, J.M., Smith, P., Hall, C. and Lim, L.** (1995) Promoter region of the transcriptional unit for human alpha 1-chimaerin, a neuron-specific GTPase-activating protein for p21rac. *Eur J Biochem* 227 (3), 636-646

108 **Dower, N.A., Stang, S.L., Bottorff, D.A., Ebinu, J.O., Dickie, P., Ostergaard, H.L. and Stone, J.C.** (2000) RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol* 1 (4), 317-321

109 **Downward, J., Graves, J.D., Warne, P.H., Rayter, S. and Cantrell, D.A.** (1990) Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* 346 (6286), 719-723

110 **Dransart, E., Olofsson, B. and Cherfils, J.** (2005) RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic* 6 (11), 957-966

111 **Du, X., Jiang, Y., Qian, W., Lu, X. and Walsh, J.P.** (2001) Fatty acids inhibit growth-factor-induced diacylglycerol kinase alpha activation in vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* 357 (Pt 1), 275-282

112 **Dulubova, I., Lou, X., Lu, J., Huryeva, I., Alam, A., Schneggenburger, R., Sudhof, T.C. and Rizo, J.** (2005) A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *Embo J* 24 (16), 2839-2850

113 **Dupuy, A.J., Morgan, K., von Lintig, F.C., Shen, H., Acar, H., Hasz, D.E., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Boss, G.R. and Largaespada, D.A.** (2001) Activation of the Rap1 guanine nucleotide exchange gene, CalDAG-GEF I, in BXH-2 murine myeloid leukemia. *J Biol Chem* 276 (15), 11804-11811

114 **Ebinu, J.O., Bottorff, D.A., Chan, E.Y., Stang, S.L., Dunn, R.J. and Stone, J.C.** (1998) RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280 (5366), 1082-1086

115 **Ebinu, J.O., Stang, S.L., Teixeira, C., Bottorff, D.A., Hooton, J., Blumberg, P.M., Barry, M., Bleakley, R.C., Ostergaard, H.L. and Stone, J.C.** (2000) RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood* 95 (10), 3199-3203

116 **Eisenmann, D.M. and Kim, S.K.** (1994) Signal transduction and cell fate specification during Caenorhabditis elegans vulval development. *Curr Opin Genet Dev* 4 (4), 508-516

117 **Endo, K., Oki, E., Biedermann, V., Kojima, H., Yoshida, K., Johannes, F.J., Kufe, D. and Datta, R.** (2000) Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C [micro] by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents. *J Biol Chem* 275 (24), 18476-18481

118 **Epand, R.M.** (1985) Diacylglycerols, lysolecithin, or hydrocarbons markedly alter the bilayer to hexagonal phase transition temperature of phosphatidylethanolamines. *Biochemistry* 24 (25), 7092-7095

119 **Epand, R.M. and Lester, D.S.** (1990) The role of membrane biophysical properties in the regulation of protein kinase C activity. *Trends Pharmacol Sci* 11 (8), 317-320

120 **Epand, R.M., Epand, R.F., Decicco, A. and Schwarz, D.** (2000) Curvature properties of novel forms of phosphatidylcholine with branched acyl chains. *Eur J Biochem* 267 (10), 2909-2915

121 **Eriksson, A., Siegbahn, A., Westermark, B., Heldin, C.H. and Claesson-Welsh, L.** (1992) PDGF alpha- and beta-receptors activate unique and common signal transduction pathways. *Embo J* 11 (2), 543-550

122 **Ernest Dodd, M., Ristich, V.L., Ray, S., Lober, R.M. and Bollag, W.B.** (2005) Regulation of protein kinase D during differentiation and proliferation of primary mouse keratinocytes. *J Invest Dermatol* 125 (2), 294-306

123 **Escalante, R. and Vicente, J.J.** (2000) Dictyostelium discoideum: a model system for differentiation and patterning. *Int J Dev Biol* 44 (8), 819-835

124 **Eto, K., Murphy, R., Kerrigan, S.W., Bertoni, A., Stuhlmann, H., Nakano, T., Leavitt, A.D. and Shattil, S.J.** (2002) Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in

integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (20), 12819-12824

125 **Evans, J.H., Murray, D., Leslie, C.C. and Falke, J.J.** (2005) Specific Translocation of PKC{alpha} to the Plasma Membrane Requires Both Ca2+ and PIP2 Recognition by Its C2 Domain. *Mol Biol Cell*

126 **Exton, J.H.** (1994) Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1212 (1), 26-42

127 **Falasca, M., Logan, S.K., Lehto, V.P., Baccante, G., Lemmon, M.A. and Schlessinger, J.** (1998) Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *Embo J* 17 (2), 414-422

128 **Fanani, M.L., Topham, M.K., Walsh, J.P. and Epand, R.M.** (2004) Lipid modulation of the activity of diacylglycerol kinase alpha- and zeta-isoforms: activation by phosphatidylethanolamine and cholesterol. *Biochemistry* 43 (46), 14767-14777

129 **Feig, L.A., Urano, T. and Cantor, S.** (1996) Evidence for a Ras/Ral signaling cascade. *Trends Biochem Sci* 21 (11), 438-441

130 **Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachee-Chardin, M., Chedeville, G., Tamary, H., Minard-Colin, V., Vilmer, E., Blanche, S., Le Deist, F., Fischer, A. and de Saint Basile, G.** (2003) Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 115 (4), 461-473

131 **Feng, J.F., Rhee, S.G. and Im, M.J.** (1996) Evidence that phospholipase delta1 is the effector in the Gh (transglutaminase II)-mediated signaling. *J Biol Chem* 271 (28), 16451-16454

132 **Fernandez, E.** (2000) Thymocyte development past the CD4(+)CD8(+) stage requires an active p38 mitogen-activated protein kinase. *Blood* 95 (4), 1356-1361

133 **Ferrari, D.M. and Soling, H.D.** (1999) The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J* 339 (Pt 1), 1-10

134 **Fields, P.E., Gajewski, T.F. and Fitch, F.W.** (1996) Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells. *Science* 271 (5253), 1276-1278

135 **Fivaz, M. and Meyer, T.** (2005) Reversible intracellular translocation of KRas but not HRas in hippocampal neurons regulated by Ca2+/calmodulin. *J Cell Biol* 170 (3), 429-441

136 **Fleming, I.N., Elliott, C.M., Collard, J.G. and Exton, J.H.** (1997) Lysophosphatidic acid induces threonine phosphorylation of Tiam1 in Swiss 3T3 fibroblasts via activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 272 (52), 33105-33110

137 **Flores, I., Casaseca, T., Martinez, A.C., Kanoh, H. and Merida, I.** (1996) Phosphatidic acid generation through interleukin 2 (IL-2)-induced alpha-diacylglycerol kinase activation is an essential step in IL-2-mediated lymphocyte proliferation. *J Biol Chem* 271 (17), 10334-10340

138 **Flores, I., Jones, D.R., Cipres, A., Diaz-Flores, E., Sanjuan, M.A. and Merida, I.** (1999) Diacylglycerol kinase inhibition prevents IL-2-induced G1 to S transition through a phosphatidylinositol-3 kinase-independent mechanism. *J Immunol* 163 (2), 708-714

139 **Foster, D.A. and Xu, L.** (2003) Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol Cancer Res* 1 (11), 789-800

140 **Fragoso, R., Ren, D., Zhang, X., Su, M.W., Burakoff, S.J. and Jin, Y.J.** (2003) Lipid raft distribution of CD4 depends on its palmitoylation and association with Lck, and evidence for CD4-induced lipid raft aggregation as an additional mechanism to enhance CD3 signaling. *J Immunol* 170 (2), 913-921

141 **Freyberg, Z., Sweeney, D., Siddhanta, A., Bourgoin, S., Frohman, M. and Shields, D.** (2001) Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12 (4), 943-955

142 **Friedl, P. and Storim, J.** (2004) Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse. *Trends Cell Biol* 14 (10), 557-567

143 **Friedl, P., den Boer, A.T. and Gunzer, M.** (2005) Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 5 (7), 532-545

144 **Friedmann, M.C., Migone, T.S., Russell, S.M. and Leonard, W.J.** (1996) Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (5), 2077-2082

145 **Fruman, D.A., Cantley, L.C. and Carpenter, C.L.** (1996) Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics* 37 (1), 113-121

146 **Fryer, B.H. and Field, J.** (2005) Rho, Rac, Pak and angiogenesis: old roles and newly identified responsibilities in endothelial cells. *Cancer Lett* 229 (1), 13-23

147 **Fujisawa, K., Fujita, A., Ishizaki, T., Saito, Y. and Narumiya, S.** (1996) Identification of the Rho-binding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. *J Biol Chem* 271 (38), 23022-23028

148 **Fukunaga-Takenaka, R., Shirai, Y., Yagi, K., Adachi, N., Sakai, N., Merino, E., Merida, I. and Saito, N.** (2005) Importance of chroman ring and tyrosine phosphorylation in the subtype-specific translocation and activation of diacylglycerol kinase alpha by D-alpha-tocopherol. *Genes Cells* 10 (4), 311-319

149 **Garcia, P., Gupta, R., Shah, S., Morris, A.J., Rudge, S.A., Scarlata, S., Petrova, V., McLaughlin, S. and Rebecchi, M.J.** (1995) The pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta 1 binds with high affinity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in bilayer membranes. *Biochemistry* 34 (49), 16228-16234

150 **Gelkop, S., Babichev, Y. and Isakov, N.** (2001) T cell activation induces direct binding of the Crk adapter protein to the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (p85) via a complex mechanism involving the Cbl protein. *J Biol Chem* 276 (39), 36174-36182

151 **Genot, E. and Cantrell, D.A.** (2000) Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 12 (3), 289-294

152 **Gerace, L., Blum, A. and Blobel, G.** (1978) Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *J Cell Biol* 79 (2 Pt 1), 546-566

153 **Ghosh, S., Strum, J.C., Sciorra, V.A., Daniel, L. and Bell, R.M.** (1996) Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 271 (14), 8472-8480

154 **Ghosh, S. and Bell, R.M.** (1997) Regulation of Raf-1 kinase by interaction with the lipid second messenger, phosphatidic acid. *Biochem Soc Trans* 25 (2), 561-565

155 **Golub, T. and Caroni, P.** (2005) PI(4,5)P2-dependent microdomain assemblies capture microtubules to promote and control leading edge motility. *J Cell Biol* 169 (1), 151-165

156 **Goni, F.M. and Alonso, A.** (1999) Structure and functional properties of diacylglycerols in membranes. *Prog Lipid Res* 38 (1), 1-48

157 **Goodwin, J.S., Drake, K.R., Rogers, C., Wright, L., Lippincott-Schwartz, J., Philips, M.R. and Kenworthy, A.K.** (2005) Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J Cell Biol* 170 (2), 261-272

158 **Goto, K. and Kondo, H.** (1993) Molecular cloning and expression of a 90-kDa diacylglycerol kinase that predominantly localizes in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (16), 7598-7602

159 **Goto, K., Funayama, M. and Kondo, H.** (1994) Cloning and expression of a cytoskeleton-associated diacylglycerol kinase that is dominantly expressed in cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (26), 13042-13046

160 **Gregory, P., Kraemer, E., Zurcher, G., Gentinetta, R., Rohrbach, V., Brodbeck, U., Andres, A.C., Ziemiecki, A. and Butikofer, P.** (2005) GPI-specific phospholipase D (GPI-PLD) is expressed during mouse development and is localized to the extracellular matrix of the developing mouse skeleton. *Bone* 37 (2), 139-147

161 **Guha, S., Rey, O. and Rozengurt, E.** (2002) Neurotensin induces protein kinase C-dependent protein kinase D activation and DNA synthesis in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer Res* 62 (6), 1632-1640

162 **Guilbault, B. and Kay, R.J.** (2004) RasGRP1 sensitizes an immature B cell line to antigen receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279 (19), 19523-19530

163 **Hafizi, S., Alindri, F., Karlsson, R. and Dahlback, B.** (2002) Interaction of Axl receptor tyrosine kinase with C1-TEN, a novel C1 domain-containing protein with homology to tensin. *Biochem Biophys Res Commun* 299 (5), 793-800

164 **Hagel, M., George, E.L., Kim, A., Tamimi, R., Opitz, S.L., Turner, C.E., Imamoto, A. and Thomas, S.M.** (2002) The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Mol Cell Biol* 22 (3), 901-915

165 **Hall, C., Monfries, C., Smith, P., Lim, H.H., Kozma, R., Ahmed, S., Vanniasingham, V., Leung, T. and Lim, L.** (1990) Novel human brain cDNA encoding a 34,000 Mr protein n-chimaerin, related to both the

regulatory domain of protein kinase C and BCR, the product of the breakpoint cluster region gene. *J Mol Biol* 211 (1), 11-16

166 **Hall, C., Sin, W.C., Teo, M., Michael, G.J., Smith, P., Dong, J.M., Lim, H.H., Manser, E., Spurr, N.K., Jones, T.A. and et al.** (1993) Alpha 2-chimerin, an SH2-containing GTPase-activating protein for the ras-related protein p21rac derived by alternate splicing of the human n-chimerin gene, is selectively expressed in brain regions and testes. *Mol Cell Biol* 13 (8), 4986-4998

167 **Hall, C., Michael, G.J., Cann, N., Ferrari, G., Teo, M., Jacobs, T., Monfries, C. and Lim, L.** (2001) alpha2-chimaerin, a Cdc42/Rac1 regulator, is selectively expressed in the rat embryonic nervous system and is involved in neuritogenesis in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Neurosci* 21 (14), 5191-5202

168 **Hall, C., Lim, L. and Leung, T.** (2005) C1, see them all. *Trends Biochem Sci* 30 (4), 169-171

169 **Hammond, S.M., Altshuller, Y.M., Sung, T.C., Rudge, S.A., Rose, K., Engebrecht, J., Morris, A.J. and Frohman, M.A.** (1995) Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J Biol Chem* 270 (50), 29640-29643

170 **Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A. and Broek, D.** (1998) Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* 279 (5350), 558-560

171 **Hancock, J.F.** (2003) Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (5), 373-384

172 **Hannun, Y.A., Loomis, C.R. and Bell, R.M.** (1985) Activation of protein kinase C by Triton X-100 mixed micelles containing diacylglycerol and phosphatidylserine. *J Biol Chem* 260 (18), 10039-10043

173 **Hanyu-Nakamura, K., Kobayashi, S. and Nakamura, A.** (2004) Germ cell-autonomous Wunen2 is required for germline development in Drosophila embryos. *Development* 131 (18), 4545-4553

174 **Harding, A., Tian, T., Westbury, E., Frische, E. and Hancock, J.F.** (2005) Subcellular localization determines MAP kinase signal output. *Curr Biol* 15 (9), 869-873

175 **Hausser, A., Link, G., Bamberg, L., Burzlaff, A., Lutz, S., Pfizenmaier, K. and Johannes, F.J.** (2002) Structural requirements for localization and activation of protein kinase C mu (PKC mu) at the Golgi compartment. *J Cell Biol* 156 (1), 65-74

176 **Hausser, A., Storz, P., Martens, S., Link, G., Toker, A. and Pfizenmaier, K.** (2005) Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 7 (9), 880-886

177 **Hawkins, P.T., Eguinoa, A., Qiu, R.G., Stokoe, D., Cooke, F.T., Walters, R., Wennstrom, S., Claesson-Welsh, L., Evans, T., Symons, M. and et al.** (1995) PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol* 5 (4), 393-403

178 **Henneberry, A.L., Wright, M.M. and McMaster, C.R.** (2002) The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of Fatty Acid and lipid head group specificity. *Mol Biol Cell* 13 (9), 3148-3161

179 **Herrera, R. and Shivers, B.D.** (1994) Expression of alpha 1-chimaerin (rac-1 GAP) alters the cytoskeletal and adhesive properties of fibroblasts. *J Cell Biochem* 56 (4), 582-591

180 **Hess, K.L., Donahue, A.C., Ng, K.L., Moore, T.I., Oak, J. and Fruman, D.A.** (2004) Frontline: The p85alpha isoform of phosphoinositide 3-kinase is essential for a subset of B cell receptor-initiated signaling responses. *Eur J Immunol* 34 (11), 2968-2976

181 **Hidalgo Carcedo, C., Bonazzi, M., Spano, S., Turacchio, G., Colanzi, A., Luini, A. and Corda, D.** (2004) Mitotic Golgi partitioning is driven by the membrane-fissioning protein CtBP3/BARS. *Science* 305 (5680), 93-96

182 **Ho, C., Slater, S.J., Stagliano, B. and Stubbs, C.D.** (2001) The C1 domain of protein kinase C as a lipid bilayer surface sensing module. *Biochemistry* 40 (34), 10334-10341

183 **Hodgkin, M.N., Pettitt, T.R., Martin, A., Michell, R.H., Pemberton, A.J. and Wakelam, M.J.** (1998) Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem Sci* 23 (6), 200-204

184 **Hofmann, S.L. and Majerus, P.W.** (1982) Modulation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity by phospholipid interactions, diglycerides, and calcium ions. *J Biol Chem* 257 (23), 14359-14364

185 **Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T. and Schultz, G.** (1999) Direct

activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397 (6716), 259-263

186 **Hogan, A., Shepherd, L., Chabot, J., Quenneville, S., Prescott, S.M., Topham, M.K. and Gee, S.H.** (2001) Interaction of gamma 1-syntrophin with diacylglycerol kinase-zeta. Regulation of nuclear localization by PDZ interactions. *J Biol Chem* 276 (28), 26526-26533

187 **Hommel, U., Zurini, M. and Luyten, M.** (1994) Solution structure of a cysteine rich domain of rat protein kinase C. *Nat Struct Biol* 1 (6), 383-387

188 **Horwitz, J. and Davis, L.L.** (1993) The substrate specificity of brain microsomal phospholipase D. *Biochem J* 295 (Pt 3), 793-798

189 **Houssa, B., Schaap, D., van der Wal, J., Goto, K., Kondo, H., Yamakawa, A., Shibata, M., Takenawa, T. and van Blitterswijk, W.J.** (1997) Cloning of a novel human diacylglycerol kinase (DGKtheta) containing three cysteine-rich domains, a proline-rich region, and a pleckstrin homology domain with an overlapping Ras-associating domain. *J Biol Chem* 272 (16), 10422-10428

190 **Houssa, B., de Widt, J., Kranenburg, O., Moolenaar, W.H. and van Blitterswijk, W.J.** (1999) Diacylglycerol kinase theta binds to and is negatively regulated by active RhoA. *J Biol Chem* 274 (11), 6820-6822

191 **Hozumi, Y., Ito, T., Nakano, T., Nakagawa, T., Aoyagi, M., Kondo, H. and Goto, K.** (2003) Nuclear localization of diacylglycerol kinase zeta in neurons. *Eur J Neurosci* 18 (6), 1448-1457

192 **Hritz, J., Ulicny, J., Laaksonen, A., Jancura, D. and Miskovsky, P.** (2004) Molecular interaction model for the C1B domain of protein kinase C-gamma in the complex with its activator phorbol-12-myristate-13-acetate in water solution and lipid bilayer. *J Med Chem* 47 (26), 6547-6555

193 **Hu, C.D., Kariya, K., Kotani, G., Shirouzu, M., Yokoyama, S. and Kataoka, T.** (1997) Coassociation of Rap1A and Ha-Ras with Raf-1 N-terminal region interferes with ras-dependent activation of Raf-1. *J Biol Chem* 272 (18), 11702-11705

194 **Hubbard, S.R., Bishop, W.R., Kirschmeier, P., George, S.J., Cramer, S.P. and Hendrickson, W.A.** (1991) Identification and characterization of zinc binding sites in protein kinase C. *Science* 254 (5039), 1776-1779

195 **Huitema, K., van den Dikkenberg, J., Brouwers, J.F. and Holthuis, J.C.** (2004) Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *Embo J* 23 (1), 33-44

196 **Hunn, M. and Quest, A.F.** (1997) Cysteine-rich regions of protein kinase Cdelta are functionally non-equivalent. Differences between cysteine-rich regions of non-calcium-dependent protein kinase Cdelta and calcium-dependent protein kinase Cgamma. *FEBS Lett* 400 (2), 226-232

197 **Hurd, C., Waldron, R.T. and Rozengurt, E.** (2002) Protein kinase D complexes with C-Jun N-terminal kinase via activation loop phosphorylation and phosphorylates the C-Jun N-terminus. *Oncogene* 21 (14), 2154-2160

198 **Hurley, J.H., Newton, A.C., Parker, P.J., Blumberg, P.M. and Nishizuka, Y.** (1997) Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci* 6 (2), 477-480

199 **Hwang, J.I., Oh, Y.S., Shin, K.J., Kim, H., Ryu, S.H. and Suh, P.G.** (2005) Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC-eta. *Biochem J* 389 (Pt 1), 181-186

200 **Igal, R.A., Caviglia, J.M., de Gomez Dumm, I.N. and Coleman, R.A.** (2001) Diacylglycerol generated in CHO cell plasma membrane by phospholipase C is used for triacylglycerol synthesis. *J Lipid Res* 42 (1), 88-95

201 **Iglesias, T. and Rozengurt, E.** (1998) Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 273 (1), 410-416

202 **Iglesias, T., Waldron, R.T. and Rozengurt, E.** (1998) Identification of in vivo phosphorylation sites required for protein kinase D activation. *J Biol Chem* 273 (42), 27662-27667

203 **Iglesias, T. and Rozengurt, E.** (1999) Protein kinase D activation by deletion of its cysteine-rich motifs. *FEBS Lett* 454 (1-2), 53-56

204 **Iglesias, T., Cabrera-Poch, N., Mitchell, M.P., Naven, T.J., Rozengurt, E. and Schiavo, G.** (2000) Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D. *J Biol Chem* 275 (51), 40048-40056

205 **Imai, S., Sakane, F. and Kanoh, H.** (2002) Phorbol ester-regulated oligomerization of diacylglycerol kinase delta linked to its phosphorylation and translocation. *J Biol Chem* 277 (38), 35323-35332

206 **Imai, S., Kai, M., Yamada, K., Kanoh, H. and Sakane, F.** (2004) The plasma membrane translocation of diacylglycerol kinase delta1 is negatively regulated by conventional protein kinase C-dependent phosphorylation at Ser-22 and Ser-26 within the pleckstrin homology domain. *Biochem J* 382 (Pt 3), 957-966

207 **Imai, S.I., Kai, M., Yasuda, S., Kanoh, H. and Sakane, F.** (2005) Identification and characterization of a novel human type II diacylglycerol kinase, DGKkappa. *J Biol Chem*

208 **Irie, K., Nakahara, A., Ohigashi, H., Fukuda, H., Wender, P.A., Konishi, H. and Kikkawa, U.** (1999) Synthesis and phorbol ester-binding studies of the individual cysteine-rich motifs of protein kinase D. *Bioorg Med Chem Lett 9 (17), 2487-2490*

209 **Irie, K., Nakahara, A., Nakagawa, Y., Ohigashi, H., Shindo, M., Fukuda, H., Konishi, H., Kikkawa, U., Kashiwagi, K. and Saito, N.** (2002) Establishment of a binding assay for protein kinase C isozymes using synthetic C1 peptides and development of new medicinal leads with protein kinase C isozyme and C1 domain selectivity. *Pharmacol Ther 93 (2-3), 271-281*

210 **Irie, K., Masuda, A., Shindo, M., Nakagawa, Y. and Ohigashi, H.** (2004) Tumor promoter binding of the protein kinase C C1 homology domain peptides of RasGRPs, chimaerins, and Unc13s. *Bioorg Med Chem 12 (17), 4575-4583*

211 **Irvin, B.J., Williams, B.L., Nilson, A.E., Maynor, H.O. and Abraham, R.T.** (2000) Pleiotropic contributions of phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) to T-cell antigen receptor-mediated signaling: reconstitution studies of a PLC-gamma1-deficient Jurkat T-cell line. *Mol Cell Biol 20 (24), 9149-9161*

212 **Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N. and Narumiya, S.** (1996) The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *Embo J 15 (8), 1885-1893*

213 **Ito, T., Hozumi, Y., Sakane, F., Saino-Saito, S., Kanoh, H., Aoyagi, M., Kondo, H. and Goto, K.** (2004) Cloning and characterization of diacylglycerol kinase iota splice variants in rat brain. *J Biol Chem 279 (22), 23317-23326*

214 **Izquierdo, M., Downward, J., Graves, J.D. and Cantrell, D.A.** (1992) Role of protein kinase C in T-cell antigen receptor regulation of p21ras: evidence that two p21ras regulatory pathways coexist in T cells. *Mol Cell Biol 12 (7), 3305-3312*

215 **Jaggi, M., Rao, P.S., Smith, D.J., Hemstreet, G.P. and Balaji, K.C.** (2003) Protein kinase C mu is down-regulated in androgen-independent prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun 307 (2), 254-260*

216 **Jaggi, M., Rao, P.S., Smith, D.J., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hemstreet, G.P. and Balaji, K.C.** (2005) E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C{mu} is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. *Cancer Res 65 (2), 483-492*

217 **Jamal, Z., Martin, A., Gomez-Munoz, A. and Brindley, D.N.** (1991) Plasma membrane fractions from rat liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol. *J Biol Chem 266 (5), 2988-2996*

218 **Jamora, C., Yamanouye, N., Van Lint, J., Laudenslager, J., Vandenheede, J.R., Faulkner, D.J. and Malhotra, V.** (1999) Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D. *Cell 98 (1), 59-68*

219 **Ji, Q.S., Winnier, G.E., Niswender, K.D., Horstman, D., Wisdom, R., Magnuson, M.A. and Carpenter, G.** (1997) Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in mammalian growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A 94 (7), 2999-3003*

220 **Jiang, H., Luo, J.Q., Urano, T., Frankel, P., Lu, Z., Foster, D.A. and Feig, L.A.** (1995) Involvement of Ral GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation. *Nature 378 (6555), 409-412*

221 **Jiang, H., Kuang, Y., Wu, Y., Xie, W., Simon, M.I. and Wu, D.** (1997) Roles of phospholipase C beta2 in chemoattractant-elicited responses. *Proc Natl Acad Sci U S A 94 (15), 7971-7975*

222 **Jiang, Y., Lu, Z., Zang, Q. and Foster, D.A.** (1996) Regulation of phosphatidic acid phosphohydrolase by epidermal growth factor. Reduced association with the EGF receptor followed by increased association with protein kinase Cepsilon. *J Biol Chem 271 (47), 29529-29532*

223 **Jimenez, C., Portela, R.A., Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Collard, J., Serrano, A., Martinez, A.C., Avila, J. and Carrera, A.C.** (2000) Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J Cell Biol 151 (2), 249-262*

224 **Jin, T.G., Satoh, T., Liao, Y., Song, C., Gao, X., Kariya, K., Hu, C.D. and Kataoka, T.** (2001) Role of the CDC25 homology domain of phospholipase

Cepsilon in amplification of Rap1-dependent signaling. *J Biol Chem 276 (32), 30301-30307*

225 **Jin, Z.Q., Zhou, H.Z., Zhu, P., Honbo, N., Mochly-Rosen, D., Messing, R.O., Goetzl, E.J., Karliner, J.S. and Gray, M.O.** (2002) Cardioprotection mediated by sphingosine-1-phosphate and ganglioside GM-1 in wild-type and PKC epsilon knockout mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol 282 (6), H1970-1977*

226 **Johnson, C.A., Balboa, M.A., Balsinde, J. and Dennis, E.A.** (1999) Regulation of cyclooxygenase-2 expression by phosphatidate phosphohydrolase in human amnionic WISH cells. *J Biol Chem 274 (39), 27689-27693*

227 **Johnson, J.E., Zimmerman, M.L., Daleke, D.L. and Newton, A.C.** (1998) Lipid structure and not membrane structure is the major determinant in the regulation of protein kinase C by phosphatidylserine. *Biochemistry 37 (35), 12020-12025*

228 **Jones, D.R., Sanjuan, M.A. and Merida, I.** (2000) Type Ialpha phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is a putative target for increased intracellular phosphatidic acid. *FEBS Lett 476 (3), 160-165*

229 **Jones, D.R., Sanjuan, M.A., Stone, J.C. and Merida, I.** (2002) Expression of a catalytically inactive form of diacylglycerol kinase alpha induces sustained signaling through RasGRP. *Faseb J 16 (6), 595-597*

230 **Jones, J.A., Rawles, R. and Hannun, Y.A.** (2005) Identification of a novel phosphatidic Acid binding domain in protein phosphatase-1. *Biochemistry 44 (40), 13235-13245*

231 **Jun, Y., Fratti, R.A. and Wickner, W.** (2004) Diacylglycerol and its formation by phospholipase C regulate Rab- and SNARE-dependent yeast vacuole fusion. *J Biol Chem 279 (51), 53186-53195*

232 **Junge, H.J., Rhee, J.S., Jahn, O., Varoqueaux, F., Spiess, J., Waxham, M.N., Rosenmund, C. and Brose, N.** (2004) Calmodulin and Munc13 form a Ca^{2+} sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity. *Cell 118 (3), 389-401*

233 **Kai, M., Sakane, F., Imai, S., Wada, I. and Kanoh, H.** (1994) Molecular cloning of a diacylglycerol kinase isozyme predominantly expressed in human retina with a truncated and inactive enzyme expression in most other human cells. *J Biol Chem 269 (28), 18492-18498*

234 **Kane, L.P., Mollenauer, M.N. and Weiss, A.** (2004) A proline-rich motif in the C terminus of Akt contributes to its localization in the immunological synapse. *J Immunol 172 (9), 5441-5449*

235 **Kanoh, H. and Ono, T.** (1986) Phosphorylation of pig brain diacylglycerol kinase by endogenous protein kinase. *FEBS Lett 201 (1), 97-100*

236 **Kanoh, H., Yamada, K., Sakane, F. and Imaizumi, T.** (1989) Phosphorylation of diacylglycerol kinase in vitro by protein kinase C. *Biochem J 258 (2), 455-462*

237 **Kanoh, H., Yamada, K. and Sakane, F.** (1990) Diacylglycerol kinase: a key modulator of signal transduction? *Trends Biochem Sci 15 (2), 47-50*

238 **Kanoh, H., Sakane, F., Imai, S. and Wada, I.** (1993) Diacylglycerol kinase and phosphatidic acid phosphatase—enzymes metabolizing lipid second messengers. *Cell Signal 5 (5), 495-503*

239 **Kanoh, H., Yamada, K. and Sakane, F.** (2002) Diacylglycerol kinases: emerging downstream regulators in cell signaling systems. *J Biochem (Tokyo) 131 (5), 629-633*

240 **Kasai, T., Ohguchi, K., Nakashima, S., Ito, Y., Naganawa, T., Kondo, N. and Nozawa, Y.** (1998) Increased activity of oleate-dependent type phospholipase D during actinomycin D-induced apoptosis in Jurkat T cells. *J Immunol 161 (12), 6469-6474*

241 **Kawasaki, H., Springett, G.M., Toki, S., Canales, J.J., Harlan, P., Blumenstiel, J.P., Chen, E.J., Bany, I.A., Mochizuki, N., Ashbacher, A., Matsuda, M., Housman, D.E. and Graybiel, A.M.** (1998) A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A 95 (22), 13278-13283*

242 **Kazanietz, M.G., Wang, S., Milne, G.W., Lewin, N.E., Liu, H.L. and Blumberg, P.M.** (1995) Residues in the second cysteine-rich region of protein kinase C delta relevant to phorbol ester binding as revealed by site-directed mutagenesis. J Biol Chem 270 (37), 21852-21859

243 **Kazanietz, M.G.** (2000) Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters. *Mol Carcinog 28 (1), 5-11*

244 **Kazanietz, M.G., Caloca, M.J., Eroles, P., Fujii, T., Garcia-Bermejo, M.L., Reilly, M. and Wang, H.** (2000) Pharmacology of the receptors for the phorbol ester tumor promoters: multiple receptors with different biochemical properties. *Biochem Pharmacol 60 (10), 1417-1424*

245 **Kazanietz, M.G.** (2002) Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol Pharmacol 61 (4), 759-767*

246 **Kearns, B.G., McGee, T.P., Mayinger, P., Gedvilaite, A., Phillips, S.E., Kagiwada, S. and Bankaitis, V.A.** (1997) Essential role for diacylglycerol in protein transport from the yeast Golgi complex. *Nature 387 (6628), 101-105*

247 **Kelley, G.G., Reks, S.E., Ondrako, J.M. and Smrcka, A.V.** (2001) Phospholipase C(epsilon): a novel Ras effector. *Embo J 20 (4), 743-754*

248 **Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R. and Nishizuka, Y.** (1983) Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem 258 (19), 11442-11445*

249 **Kim, D., Jun, K.S., Lee, S.B., Kang, N.G., Min, D.S., Kim, Y.H., Ryu, S.H., Suh, P.G. and Shin, H.S.** (1997) Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature 389 (6648), 290-293*

250 **Kim, J.H., Lee, S.D., Han, J.M., Lee, T.G., Kim, Y., Park, J.B., Lambeth, J.D., Suh, P.G. and Ryu, S.H.** (1998) Activation of phospholipase D1 by direct interaction with ADP-ribosylation factor 1 and RalA. *FEBS Lett 430 (3), 231-235*

251 **Kim, J.H., Kim, Y., Lee, S.D., Lopez, I., Arnold, R.S., Lambeth, J.D., Suh, P.G. and Ryu, S.H.** (1999) Selective activation of phospholipase D2 by unsaturated fatty acid. *FEBS Lett 454 (1-2), 42-46*

252 **Kim, J.K., Fillmore, J.J., Sunshine, M.J., Albrecht, B., Higashimori, T., Kim, D.W., Liu, Z.X., Soos, T.J., Cline, G.W., O'Brien, W.R., Littman, D.R. and Shulman, G.I.** (2004) PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 114 (6), 823-827

253 **Kim, R., Trubetskoy, A., Suzuki, T., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. and Lenz, J.** (2003) Genome-based identification of cancer genes by proviral tagging in mouse retrovirus-induced T-cell lymphomas. *J Virol* 77 (3), 2056-2062

254 **Klauck, T.M., Xu, X., Mousseau, B. and Jaken, S.** (1996) Cloning and characterization of a glucocorticoid-induced diacylglycerol kinase. *J Biol Chem* 271 (33), 19781-19788

255 **Klein, G., Schaefer, A., Hilfiker-Kleiner, D., Oppermann, D., Shukla, P., Quint, A., Podewski, E., Hilfiker, A., Schroder, F., Leitges, M. and Drexler, H.** (2005) Increased collagen deposition and diastolic dysfunction but preserved myocardial hypertrophy after pressure overload in mice lacking PKCepsilon. *Circ Res* 96 (7), 748-755

256 **Klinger, M.B., Guilbault, B., Goulding, R.E. and Kay, R.J.** (2005) Deregulated expression of RasGRP1 initiates thymic lymphomagenesis independently of T-cell receptors. *Oncogene* 24 (16), 2695-2704

257 **Kobayashi, M. and Kanfer, J.N.** (1987) Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylation by rat brain synaptosomal phospholipase D. *J Neurochem* 48 (5), 1597-1603

258 **Koch, H., Hofmann, K. and Brose, N.** (2000) Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed Munc13 isoform. *Biochem J* 349 (Pt 1), 247-253

259 **Kohyama-Koganeya, A., Watanabe, M. and Hotta, Y.** (1997) Molecular cloning of a diacylglycerol kinase isozyme predominantly expressed in rat retina. *FEBS Lett* 409 (2), 258-264

260 **Kooijman, E.E., Chupin, V., de Kruijff, B. and Burger, K.N.** (2003) Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic* 4 (3), 162-174

261 **Kooijman, E.E., Chupin, V., Fuller, N.L., Kozlov, M.M., de Kruijff, B., Burger, K.N. and Rand, P.R.** (2005) Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry* 44 (6), 2097-2102

262 **Kouchi, Z., Fukami, K., Shikano, T., Oda, S., Nakamura, Y., Takenawa, T. and Miyazaki, S.** (2004) Recombinant phospholipase Czeta has high Ca2+ sensitivity and induces Ca2+ oscillations in mouse eggs. *J Biol Chem* 279 (11), 10408-10412

263 **Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. and Lim, L.** (1996) The GTPase-activating protein n-chimaerin cooperates with Rac1 and Cdc42Hs to induce the formation of lamellipodia and filopodia. *Mol Cell Biol* 16 (9), 5069-5080

264 **Kramer, R.M., Checani, G.C. and Deykin, D.** (1987) Stimulation of Ca2+-activated human platelet phospholipase A2 by diacylglycerol. *Biochem J* 248 (3), 779-783

265 **Ktistakis, N.T., Brown, H.A., Waters, M.G., Sternweis, P.C. and Roth, M.G.** (1996) Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-

dependent formation of Golgi coated vesicles. *J Cell Biol* 134 (2), 295-306

266 **Kurscheid-Reich, D., Throckmorton, D.C. and Rasmussen, H.** (1995) Serotonin activates phospholipase D in rat mesangial cells. *Am J Physiol* 268 (6 Pt 2), F997-1003

267 **Larman, M.G., Saunders, C.M., Carroll, J., Lai, F.A. and Swann, K.** (2004) Cell cycle-dependent Ca2+ oscillations in mouse embryos are regulated by nuclear targeting of PLCzeta. *J Cell Sci* 117 (Pt 12), 2513-2521

268 **Laulagnier, K., Grand, D., Dujardin, A., Hamdi, S., Vincent-Schneider, H., Lankar, D., Salles, J.P., Bonnerot, C., Perret, B. and Record, M.** (2004) PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. *FEBS Lett* 572 (1-3), 11-14

269 **Layer, K., Lin, G., Nencioni, A., Hu, W., Schmucker, A., Antov, A.N., Li, X., Takamatsu, S., Chevassut, T., Dower, N.A., Stang, S.L., Beier, D., Buhlmann, J., Bronson, R.T., Elkon, K.B., Stone, J.C., Van Parijs, L. and Lim, B.** (2003) Autoimmunity as the consequence of a spontaneous mutation in Rasgrp1. *Immunity* 19 (2), 243-255

270 **Lee, I.K., Koya, D., Ishi, H., Kanoh, H. and King, G.L.** (1999) d-Alpha-tocopherol prevents the hyperglycemia induced activation of diacylglycerol (DAG)-protein kinase C (PKC) pathway in vascular smooth muscle cell by an increase of DAG kinase activity. *Diabetes Res Clin Pract* 45 (2-3), 183-190

271 **Lee, J.S., Kim, J.H., Jang, I.H., Kim, H.S., Han, J.M., Kazlauskas, A., Yagisawa, H., Suh, P.G. and Ryu, S.H.** (2005) Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate specifically interacts with the phox homology domain of phospholipase D1 and stimulates its activity. *J Cell Sci* 118 (Pt 19), 4405-4413

272 **Leitges, M., Schmedt, C., Guinamard, R., Davoust, J., Schaal, S., Stabel, S. and Tarakhovsky, A.** (1996) Immunodeficiency in protein kinase cbeta-deficient mice. *Science* 273 (5276), 788-791

273 **Leitges, M., Plomann, M., Standaert, M.L., Bandyopadhyay, G., Sajan, M.P., Kanoh, Y. and Farese, R.V.** (2002) Knockout of PKC alpha enhances insulin signaling through PI3K. *Mol Endocrinol* 16 (4), 847-858

274 **Lentz, B.R., Malinin, V., Haque, M.E. and Evans, K.** (2000) Protein machines and lipid assemblies: current views of cell membrane fusion. *Curr Opin Struct Biol* 10 (5), 607-615

275 **Leung, T., How, B.E., Manser, E. and Lim, L.** (1993) Germ cell beta-chimaerin, a new GTPase-activating protein for p21rac, is specifically expressed during the acrosomal assembly stage in rat testis. *J Biol Chem* 268 (6), 3813-3816

276 **Leung, T., How, B.E., Manser, E. and Lim, L.** (1994) Cerebellar beta 2-chimaerin, a GTPase-activating protein for p21 ras-related rac is specifically expressed in granule cells and has a unique N-terminal SH2 domain. *J Biol Chem* 269 (17), 12888-12892

277 **Leung, T., Chen, X.Q., Tan, I., Manser, E. and Lim, L.** (1998) Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol* 18 (1), 130-140

278 **Lewit-Bentley, A. and Rety, S.** (2000) EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10 (6), 637-643

279 **Li, J., Shen, H., Himmel, K.L., Dupuy, A.J., Largaespada, D.A., Nakamura, T., Shaughnessy, J.D., Jr., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G.** (1999) Leukaemia disease genes: large-scale cloning and pathway predictions. *Nat Genet* 23 (3), 348-353

280 **Li, J., O'Connor, K.L., Hellmich, M.R., Greeley, G.H., Jr., Townsend, C.M., Jr. and Evers, B.M.** (2004) The role of protein kinase D in neurotensin secretion mediated by protein kinase C-alpha/-delta and Rho/Rho kinase. *J Biol Chem* 279 (27), 28466-28474

281 **Li, L., Yang, Y. and Stevens, R.L.** (2002) Cloning of rat Ras guanine nucleotide releasing protein 4, and evaluation of its expression in rat mast cells and their bone marrow progenitors. *Mol Immunol* 38 (16-18), 1283-1288

282 **Li, L., Yang, Y., Wong, G.W. and Stevens, R.L.** (2003) Mast cells in airway hyporesponsive C3H/HeJ mice express a unique isoform of the signaling protein Ras guanine nucleotide releasing protein 4 that is unresponsive to diacylglycerol and phorbol esters. *J Immunol* 171 (1), 390-397

283 **Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B. and Schlessinger, J.** (1993) Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 363 (6424), 85-88

284 **Li, W., Whaley, C.D., Mondino, A. and Mueller, D.L.** (1996) Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells. *Science* 271 (5253), 1272-1276

285 **Liao, H.J., Kume, T., McKay, C., Xu, M.J., Ihle, J.N. and Carpenter, G.** (2002) Absence of erythrogenesis and vasculogenesis in Plcg1-deficient mice. *J Biol Chem* 277 (11), 9335-9341

286 **Liljedahl, M., Maeda, Y., Colanzi, A., Ayala, I., Van Lint, J. and Malhotra, V.** (2001) Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell* 104 (3), 409-420

287 **Liscovitch, M., Chalifa, V., Pertile, P., Chen, C.S. and Cantley, L.C.** (1994) Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J Biol Chem* 269 (34), 21403-21406

288 **Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G. and Tang, X.** (2000) Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J* 345 Pt 3, 401-415

289 **Littler, C.M., Morris, K.G., Jr., Fagan, K.A., McMurtry, I.F., Messing, R.O. and Dempsey, E.C.** (2003) Protein kinase C-epsilon-null mice have decreased hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284 (4), H1321-1331

290 **Litvak, V., Dahan, N., Ramachandran, S., Sabanay, H. and Lev, S.** (2005) Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function. *Nat Cell Biol* 7 (3), 225-234

291 **Liu, Z., Chang, G.Q. and Leibowitz, S.F.** (2001) Diacylglycerol kinase zeta in hypothalamus interacts with long form leptin receptor. Relation to dietary fat and body weight regulation. *J Biol Chem* 276 (8), 5900-5907

292 **Loewen, C.J., Gaspar, M.L., Jesch, S.A., Delon, C., Ktistakis, N.T., Henry, S.A. and Levine, T.P.** (2004) Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science* 304 (5677), 1644-1647

293 **Lopez, I., Mak, E.C., Ding, J., Hamm, H.E. and Lomasney, J.W.** (2001) A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 276 (4), 2758-2765

294 **Lorenzo, P.S., Beheshti, M., Pettit, G.R., Stone, J.C. and Blumberg, P.M.** (2000) The guanine nucleotide exchange factor RasGRP is a high -affinity target for diacylglycerol and phorbol esters. *Mol Pharmacol* 57 (5), 840-846

295 **Lorenzo, P.S., Kung, J.W., Bottorff, D.A., Garfield, S.H., Stone, J.C. and Blumberg, P.M.** (2001) Phorbol esters modulate the Ras exchange factor RasGRP3. *Cancer Res* 61 (3), 943-949

296 **Los, A.P., van Baal, J., de Widt, J., Divecha, N. and van Blitterswijk, W.J.** (2004) Structure-activity relationship of diacylglycerol kinase theta. *Biochim Biophys Acta* 1636 (2-3), 169-174

297 **Los, A.P., Vinke, F.P., de Widt, J., Topham, M.K., van Blitterswijk, W.J. and Divecha, N.** (2005) The retinoblastoma family of proteins bind to and activate diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem*

298 **Luberto, C. and Hannun, Y.A.** (1998) Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation. Does sphingomyelin synthase account for the putative phosphatidylcholine-specific phospholipase C? *J Biol Chem* 273 (23), 14550-14559

299 **Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T. and Zufall, F.** (2003) A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40 (3), 551-561

300 **Lukiw, W.J., Cui, J.G., Musto, A.E., Musto, B.C. and Bazan, N.G.** (2005) Epileptogenesis in diacylglycerol kinase epsilon deficiency up-regulates COX-2 and tyrosine hydroxylase in hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun*

301 **Luo, B., Prescott, S.M. and Topham, M.K.** (2003) Association of diacylglycerol kinase zeta with protein kinase C alpha: spatial regulation of diacylglycerol signaling. *J Cell Biol* 160 (6), 929-937

302 **Luo, B., Prescott, S.M. and Topham, M.K.** (2003) Protein kinase C alpha phosphorylates and negatively regulates diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem* 278 (41), 39542-39547

303 **Luo, B., Prescott, S.M. and Topham, M.K.** (2004) Diacylglycerol kinase zeta regulates phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Ialpha by a novel mechanism. *Cell Signal* 16 (8), 891-897

304 **Luo, B., Regier, D.S., Prescott, S.M. and Topham, M.K.** (2004) Diacylglycerol kinases. *Cell Signal* 16 (9), 983-989

305 **Luo, J.Q., Liu, X., Hammond, S.M., Colley, W.C., Feig, L.A., Frohman, M.A., Morris, A.J. and Foster, D.A.** (1997) RalA interacts directly with the Arf-

responsive, PIP2-dependent phospholipase D1. *Biochem Biophys Res Commun* 235 (3), 854-859

306 **Lysechko, T.L. and Ostergaard, H.L.** (2005) Differential Src family kinase activity requirements for CD3 zeta phosphorylation/ZAP70 recruitment and CD3 epsilon phosphorylation. *J Immunol* 174 (12), 7807-7814

307 **Machesky, L.M. and Hall, A.** (1996) Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 6 (8), 304-310

308 **Macian, F., Garcia-Cozar, F., Im, S.H., Horton, H.F., Byrne, M.C. and Rao, A.** (2002) Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109 (6), 719-731

309 **Madaule, P., Furuyashiki, T., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Morii, N. and Narumiya, S.** (1995) A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS Lett* 377 (2), 243-248

310 **Madesh, M. and Balasubramanian, K.A.** (1997) Metal ion stimulation of phospholipase D-like activity of isolated rat intestinal mitochondria. *Lipids* 32 (5), 471-479

311 **Maeda, Y., Beznoussenko, G.V., Van Lint, J., Mironov, A.A. and Malhotra, V.** (2001) Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain. *Embo J* 20 (21), 5982-5990

312 **Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson, M.F. and Marshall, C.J.** (1998) Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science* 280 (5360), 109-112

313 **Margarit, S.M., Sondermann, H., Hall, B.E., Nagar, B., Hoelz, A., Pirruccello, M., Bar-Sagi, D. and Kuriyan, J.** (2003) Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell* 112 (5), 685-695

314 **Mariathasan, S., Zakarian, A., Bouchard, D., Michie, A.M., Zuniga-Pflucker, J.C. and Ohashi, P.S.** (2001) Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J Immunol* 167 (9), 4966-4973

315 **Marin-Vicente, C., Gomez-Fernandez, J.C. and Corbalan-Garcia, S.** (2005) The ATP-dependent membrane localization of protein kinase C{alpha} is regulated by Ca(2+) influx and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in differentiated PC12 cells. *Mol Biol Cell* 16 (6), 2848-2861

316 **Marklund, U., Lightfoot, K. and Cantrell, D.** (2003) Intracellular location and cell context-dependent function of protein kinase D. *Immunity* 19 (4), 491-501

317 **Marshall, C.J.** (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80 (2), 179-185

318 **Marshall, M.S.** (1995) Ras target proteins in eukaryotic cells. *Faseb J* 9 (13), 1311-1318

319 **Matthews, S., Iglesias, T., Cantrell, D. and Rozengurt, E.** (1999) Dynamic re-distribution of protein kinase D (PKD) as revealed by a GFP-PKD fusion protein: dissociation from PKD activation. *FEBS Lett* 457 (3), 515-521

320 **Matthews, S.A., Rozengurt, E. and Cantrell, D.** (1999) Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/Protein kinase Cmu. *J Biol Chem* 274 (37), 26543-26549

321 **Matthews, S.A., Iglesias, T., Rozengurt, E. and Cantrell, D.** (2000) Spatial and temporal regulation of protein kinase D (PKD). *Embo J* 19 (12), 2935-2945

322 **Matthews, S.A., Rozengurt, E. and Cantrell, D.** (2000) Protein kinase D. A selective target for antigen receptors and a downstream target for protein kinase C in lymphocytes. *J Exp Med* 191 (12), 2075-2082

323 **Mayr, M., Chung, Y.L., Mayr, U., McGregor, E., Troy, H., Baier, G., Leitges, M., Dunn, M.J., Griffiths, J.R. and Xu, Q.** (2004) Loss of PKC-delta alters cardiac metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287 (2), H937-945

324 **Mayr, M., Metzler, B., Chung, Y.L., McGregor, E., Mayr, U., Troy, H., Hu, Y., Leitges, M., Pachinger, O., Griffiths, J.R., Dunn, M.J. and Xu, Q.** (2004) Ischemic preconditioning exaggerates cardiac damage in PKC-delta null mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287 (2), H946-956

325 **Mecklenbrauker, I., Saijo, K., Zheng, N.Y., Leitges, M. and Tarakhovsky, A.** (2002) Protein kinase Cdelta controls self-antigen-induced B-cell tolerance. *Nature* 416 (6883), 860-865

326 **Medeiros, R.B., Dickey, D.M., Chung, H., Quale, A.C., Nagarajan, L.R., Billadeau, D.D. and Shimizu, Y.** (2005) Protein kinase D1 and the beta 1 integrin cytoplasmic domain control beta 1 integrin function via regulation of Rap1 activation. *Immunity* 23 (2), 213-226

327 **Medkova, M. and Cho, W.** (1999) Interplay of C1 and C2 domains of protein kinase C-alpha in its membrane binding and activation. *J Biol Chem* 274 (28), 19852-19861

328 **Meier, K.E., Gibbs, T.C., Knoepp, S.M. and Ella, K.M.** (1999) Expression of phospholipase D isoforms in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1439 (2), 199-213

329 **Merida, I., Diez, E. and Gaulton, G.N.** (1991) IL-2 binding activates a tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase. *J Immunol* 147 (7), 2202-2207

330 **Merida, I., Williamson, P., Kuziel, W.A., Greene, W.C. and Gaulton, G.N.** (1993) The serine-rich cytoplasmic domain of the interleukin-2 receptor beta chain is essential for interleukin-2-dependent tyrosine protein kinase and phosphatidylinositol-3-kinase activation. *J Biol Chem* 268 (9), 6765-6770

331 **Merida, I., Williamson, P., Smith, K. and Gaulton, G.N.** (1993) The role of diacylglycerol kinase activation and phosphatidate accumulation in interleukin-2-dependent lymphocyte proliferation. *DNA Cell Biol* 12 (6), 473-479

332 **Miyaji, M., Jin, Z.X., Yamaoka, S., Amakawa, R., Fukuhara, S., Sato, S.B., Kobayashi, T., Domae, N., Mimori, T., Bloom, E.T., Okazaki, T. and Umehara, H.** (2005) Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* 202 (2), 249-259

333 **Miyamoto, A., Nakayama, K., Imaki, H., Hirose, S., Jiang, Y., Abe, M., Tsukiyama, T., Nagahama, H., Ohno, S., Hatakeyama, S. and Nakayama, K.I.** (2002) Increased proliferation of B cells and autoimmunity in mice lacking protein kinase Cdelta. *Nature* 416 (6883), 865-869

334 **Mizuno, T., Yamashita, T. and Tohyama, M.** (2004) Chimaerins act downstream from neurotrophins in overcoming the inhibition of neurite outgrowth produced by myelin-associated glycoprotein. *J Neurochem* 91 (2), 395-403

335 **Mochly-Rosen, D.** (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 268 (5208), 247-251

336 **Moon, J.J. and Nelson, B.H.** (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase potentiates, but does not trigger, T cell proliferation mediated by the IL-2 receptor. *J Immunol* 167 (5), 2714-2723

337 **Murakami, T., Sakane, F., Imai, S., Houkin, K. and Kanoh, H.** (2003) Identification and characterization of two splice variants of human diacylglycerol kinase eta. *J Biol Chem* 278 (36), 34364-34372

338 **Nagaya, H., Wada, I., Jia, Y.J. and Kanoh, H.** (2002) Diacylglycerol kinase delta suppresses ER-to-Golgi traffic via its SAM and PH domains. *Mol Biol Cell* 13 (1), 302-316

339 **Nakaoka, H., Perez, D.M., Baek, K.J., Das, T., Husain, A., Misono, K., Im, M.J. and Graham, R.M.** (1994) Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science* 264 (5165), 1593-1596

340 **Nanjundan, M. and Possmayer, F.** (2003) Pulmonary phosphatidic acid phosphatase and lipid phosphate phosphohydrolase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284 (1), L1-23

341 **Nelson, B.H. and Willerford, D.M.** (1998) Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* 70, 1-81

342 **Newton, A.C.** (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 270 (48), 28495-28498

343 **Newton, A.C.** (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 9 (2), 161-167

344 **Nguyen, D.H., Giri, B., Collins, G. and Taub, D.D.** (2005) Dynamic reorganization of chemokine receptors, cholesterol, lipid rafts, and adhesion molecules to sites of CD4 engagement. *Exp Cell Res* 304 (2), 559-569

345 **Nieva, J.L., Alonso, A., Basanez, G., Goni, F.M., Gulik, A., Vargas, R. and Luzzati, V.** (1995) Topological properties of two cubic phases of a phospholipid:cholesterol:diacylglycerol aqueous system and their possible implications in the phospholipase C-induced liposome fusion. *FEBS Lett* 368 (1), 143-147

346 **Nilssen, L.S., Dajani, O., Christoffersen, T. and Sandnes, D.** (2005) Sustained diacylglycerol accumulation resulting from prolonged G protein-coupled receptor agonist-induced phosphoinositide breakdown in hepatocytes. *J Cell Biochem* 94 (2), 389-402

347 **Nishikawa, K., Toker, A., Wong, K., Marignani, P.A., Johannes, F.J. and Cantley, L.C.** (1998) Association of protein kinase Cmu with type II phosphatidylinositol 4-kinase and type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J Biol Chem* 273 (36), 23126-23133

348 **Niv, H., Gutman, O., Kloog, Y. and Henis, Y.I.** (2002) Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells. *J Cell Biol* 157 (5), 865-872

349 **Norment, A.M., Bogatzki, L.Y., Klinger, M., Ojala, E.W., Bevan, M.J. and Kay, R.J.** (2003) Transgenic expression of RasGRP1 induces the maturation of double-negative thymocytes and enhances the production of CD8 single-positive thymocytes. *J Immunol* 170 (3), 1141-1149

350 **O'Shea, C.C., Crompton, T., Rosewell, I.R., Hayday, A.C. and Owen, M.J.** (1996) Raf regulates positive selection. *Eur J Immunol* 26 (10), 2350-2355

351 **Oancea, E., Teruel, M.N., Quest, A.F. and Meyer, T.** (1998) Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J Cell Biol* 140 (3), 485-498

352 **Oancea, E. and Meyer, T.** (1998) Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* 95 (3), 307-318

353 **Oancea, E., Bezzerides, V.J., Greka, A. and Clapham, D.E.** (2003) Mechanism of persistent protein kinase D1 translocation and activation. *Dev Cell* 4 (4), 561-574

354 **Ochoa, W.F., Garcia-Garcia, J., Fita, I., Corbalan-Garcia, S., Verdaguer, N. and Gomez-Fernandez, J.C.** (2001) Structure of the C2 domain from novel protein kinase Cepsilon. A membrane binding model for Ca(2+)-independent C2 domains. *J Mol Biol* 311 (4), 837-849

355 **Oh-hora, M., Johmura, S., Hashimoto, A., Hikida, M. and Kurosaki, T.** (2003) Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C-gamma2 to Ras in B cell receptor signaling. *J Exp Med* 198 (12), 1841-1851

356 **Ohba, Y., Mochizuki, N., Yamashita, S., Chan, A.M., Schrader, J.W., Hattori, S., Nagashima, K. and Matsuda, M.** (2000) Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem* 275 (26), 20020-20026

357 **Okada, T., Inoue, R., Yamazaki, K., Maeda, A., Kurosaki, T., Yamakuni, T., Tanaka, I., Shimizu, S., Ikenaka, K., Imoto, K. and Mori, Y.** (1999) Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca(2+)-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 274 (39), 27359-27370

358 **Okamura, S. and Yamashita, S.** (1994) Purification and characterization of phosphatidylcholine phospholipase D from pig lung. *J Biol Chem* 269 (49), 31207-31213

359 **Olive, M.F., Mehmert, K.K., Messing, R.O. and Hodge, C.W.** (2000) Reduced operant ethanol self-administration and in vivo mesolimbic dopamine responses to ethanol in PKCepsilon-deficient mice. *Eur J Neurosci* 12 (11), 4131-4140

360 **Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.** (1989) Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (13), 4868-4871

361 **Orita, S., Naito, A., Sakaguchi, G., Maeda, M., Igarashi, H., Sasaki, T. and Takai, Y.** (1997) Physical and functional interactions of Doc2 and Munc13 in Ca2+-dependent exocytotic machinery. *J Biol Chem* 272 (26), 16081-16084

362 **Outram, S.V., Crompton, T., Merida, I., Varas, A. and Martinez, A.C.** (2002) Diacylglycerol kinase alpha activity promotes survival of CD4+ 8+ double positive cells during thymocyte development. *Immunology* 105 (4), 391-398

363 **Ozaki, N., Miura, Y., Yamada, T., Kato, Y. and Oiso, Y.** (2005) RasGRP3 mediates phorbol ester-induced, protein kinase C-independent exocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 329 (2), 765-771

364 **Panagia, V., Ou, C., Taira, Y., Dai, J. and Dhalla, N.S.** (1991) Phospholipase D activity in subcellular membranes of rat ventricular myocardium. *Biochim Biophys Acta* 1064 (2), 242-250

365 **Parekh, D.B., Ziegler, W. and Parker, P.J.** (2000) Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *Embo J* 19 (4), 496-503

366 **Park, D., Jhon, D.Y., Lee, C.W., Lee, K.H. and Rhee, S.G.** (1993) Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *J Biol Chem* 268 (7), 4573-4576

367 **Park, W., Mosteller, R.D. and Broek, D.** (1994) Amino acid residues in the CDC25 guanine nucleotide exchange factor critical for interaction with Ras. *Mol Cell Biol* 14 (12), 8117-8122

368 **Parra, M., Kasler, H., McKinsey, T.A., Olson, E.N. and Verdin, E.** (2005) Protein kinase D1 phosphorylates

HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation. *J Biol Chem* 280 (14), 13762-13770

369 **Perez de Castro, I., Bivona, T.G., Philips, M.R. and Pellicer, A.** (2004) Ras activation in Jurkat T cells following low-grade stimulation of the T-cell receptor is specific to N-Ras and occurs only on the Golgi apparatus. *Mol Cell Biol* 24 (8), 3485-3496

370 **Pettitt, T.R., Martin, A., Horton, T., Liossis, C., Lord, J.M. and Wakelam, M.J.** (1997) Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipases C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and functions. Phospholipase D-derived diacylglycerol does not activate protein kinase C in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 272 (28), 17354-17359

371 **Pettitt, T.R. and Wakelam, M.J.** (1999) Diacylglycerol kinase epsilon, but not zeta, selectively removes polyunsaturated diacylglycerol, inducing altered protein kinase C distribution in vivo. *J Biol Chem* 274 (51), 36181-36186

372 **Pfeifhofer, C., Kofler, K., Gruber, T., Tabrizi, N.G., Lutz, C., Maly, K., Leitges, M. and Baier, G.** (2003) Protein kinase C theta affects Ca2+ mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells. *J Exp Med* 197 (11), 1525-1535

373 **Philips, M.R.** (2005) Compartmentalized signalling of Ras. *Biochem Soc Trans* 33 (Pt 4), 657-661

374 **Priatel, J.J., Teh, S.J., Dower, N.A., Stone, J.C. and Teh, H.S.** (2002) RasGRP1 transduces low-grade TCR signals which are critical for T cell development, homeostasis, and differentiation. *Immunity* 17 (5), 617-627

375 **Prigozhina, N.L. and Waterman-Storer, C.M.** (2004) Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility. *Curr Biol* 14 (2), 88-98

376 **Prior, I.A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R.G. and Hancock, J.F.** (2001) GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol* 3 (4), 368-375

377 **Qi, R.Z., Ching, Y.P., Kung, H.F. and Wang, J.H.** (2004) Alpha-chimaerin exists in a functional complex with the Cdk5 kinase in brain. *FEBS Lett* 561 (1-3), 177-180

378 **Quest, A.F., Bardes, E.S. and Bell, R.M.** (1994) A phorbol ester binding domain of protein kinase C gamma. High affinity binding to a glutathione-S-transferase/Cys2 fusion protein. *J Biol Chem* 269 (4), 2953-2960

379 **Quest, A.F., Bardes, E.S. and Bell, R.M.** (1994) A phorbol ester binding domain of protein kinase C gamma. Deletion analysis of the Cys2 domain defines a minimal 43-amino acid peptide. *J Biol Chem* 269 (4), 2961-2970

380 **Quest, A.F. and Bell, R.M.** (1994) The regulatory region of protein kinase C gamma. Studies of phorbol ester binding to individual and combined functional segments expressed as glutathione S-transferase fusion proteins indicate a complex mechanism of regulation by phospholipids, phorbol esters, and divalent cations. *J Biol Chem* 269 (31), 20000-20012

381 **Rambaratsingh, R.A., Stone, J.C., Blumberg, P.M. and Lorenzo, P.S.** (2003) RasGRP1 represents a novel non-protein kinase C phorbol ester signaling pathway in mouse epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 278 (52), 52792-52801

382 **Rebecchi, M.J. and Pentyala, S.N.** (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 80 (4), 1291-1335

383 **Rebhun, J.F., Castro, A.F. and Quilliam, L.A.** (2000) Identification of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for the Rap1 GTPase. Regulation of MR-GEF by M-Ras-GTP interaction. *J Biol Chem* 275 (45), 34901-34908

384 **Regier, D.S., Higbee, J., Lund, K.M., Sakane, F., Prescott, S.M. and Topham, M.K.** (2005) Diacylglycerol kinase iota regulates Ras guanyl-releasing protein 3 and inhibits Rap1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (21), 7595-7600

385 **Reuther, G.W., Lambert, Q.T., Rebhun, J.F., Caligiuri, M.A., Quilliam, L.A. and Der, C.J.** (2002) RasGRP4 is a novel Ras activator isolated from acute myeloid leukemia. *J Biol Chem* 277 (34), 30508-30514

386 **Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B. and Trautmann, A.** (2001) Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2 (10), 925-931

387 **Rey, O., Young, S.H., Cantrell, D. and Rozengurt, E.** (2001) Rapid protein kinase D translocation in response to G protein-coupled receptor activation. Dependence on protein kinase C. *J Biol Chem* 276 (35), 32616-32626

388 **Rey, O. and Rozengurt, E.** (2001) Protein kinase D interacts with Golgi via its cysteine-rich domain. *Biochem Biophys Res Commun* 287 (1), 21-26

389 **Rey, O., Sinnett-Smith, J., Zhukova, E. and Rozengurt, E.** (2001) Regulated nucleocytoplasmic transport of protein kinase D in response to G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* 276 (52), 49228-49235

390 **Rey, O., Zhukova, E., Sinnett-Smith, J. and Rozengurt, E.** (2003) Vasopressin-induced intracellular redistribution of protein kinase D in intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* 196 (3), 483-492

391 **Rey, O., Yuan, J. and Rozengurt, E.** (2003) Intracellular redistribution of protein kinase D2 in response to G-protein-coupled receptor agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 302 (4), 817-824

392 **Rey, O., Yuan, J., Young, S.H. and Rozengurt, E.** (2003) Protein kinase C nu/protein kinase D3 nuclear localization, catalytic activation, and intracellular redistribution in response to G protein-coupled receptor agonists. *J Biol Chem* 278 (26), 23773-23785

393 **Rey, O., Reeve, J.R., Jr., Zhukova, E., Sinnett-Smith, J. and Rozengurt, E.** (2004) G protein-coupled receptor-mediated phosphorylation of the activation loop of protein kinase D: dependence on plasma membrane translocation and protein kinase Cepsilon. *J Biol Chem* 279 (33), 34361-34372

394 **Reynolds, L.F., de Bettignies, C., Norton, T., Beeser, A., Chernoff, J. and Tybulewicz, V.L.** (2004) Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of the Ras/ERK pathway via LAT, Sos, and RasGRP1. *J Biol Chem* 279 (18), 18239-18246

395 **Roberts, D.M., Anderson, A.L., Hidaka, M., Swetenburg, R.L., Patterson, C., Stanford, W.L. and Bautch, V.L.** (2004) A vascular gene trap screen defines RasGRP3 as an angiogenesis-regulated gene required for the endothelial response to phorbol esters. *Mol Cell Biol* 24 (24), 10515-10528

396 **Roberts, R., Sciorra, V.A. and Morris, A.J.** (1998) Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. *J Biol Chem* 273 (34), 22059-22067

397 **Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P.J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A. and Bastiaens, P.I.** (2005) An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* 307 (5716), 1746-1752

398 **Rodriguez de Turco, E.B., Tang, W., Topham, M.K., Sakane, F., Marcheselli, V.L., Chen, C., Taketomi, A., Prescott, S.M. and Bazan, N.G.** (2001) Diacylglycerol kinase epsilon regulates seizure susceptibility and long-term potentiation through arachidonoyl- inositol lipid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (8), 4740-4745

399 **Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M.D. and Downward, J.** (1996) Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *Embo J* 15 (10), 2442-2451

400 **Romans, P., Firtel, R.A. and Saxe, C.L., 3rd.** (1985) Gene-specific expression of the actin multigene family of Dictyostelium discoideum. *J Mol Biol* 186 (2), 337-355

401 **Rong, S.B., Enyedy, I.J., Qiao, L., Zhao, L., Ma, D., Pearce, L.L., Lorenzo, P.S., Stone, J.C., Blumberg, P.M., Wang, S. and Kozikowski, A.P.** (2002) Structural basis of RasGRP binding to high-affinity PKC ligands. *J Med Chem* 45 (4), 853-860

402 **Roose, J.P., Mollenauer, M., Gupta, V.A., Stone, J. and Weiss, A.** (2005) A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol Cell Biol* 25 (11), 4426-4441

403 **Rossner, S., Fuchsbrunner, K., Lange-Dohna, C., Hartlage-Rubsamen, M., Bigl, V., Betz, A., Reim, K. and Brose, N.** (2004) Munc13-1-mediated vesicle priming contributes to secretory amyloid precursor protein processing. *J Biol Chem* 279 (27), 27841-27844

404 **Roth, M.G.** (1999) Lipid regulators of membrane traffic through the Golgi complex. *Trends Cell Biol* 9 (5), 174-179

405 **Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J.F. and Parton, R.G.** (1999) Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1 (2), 98-105

406 **Roy, S., Plowman, S., Rotblat, B., Prior, I.A., Muncke, C., Grainger, S., Parton, R.G., Henis, Y.I., Kloog, Y. and Hancock, J.F.** (2005) Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling. *Mol Cell Biol* 25 (15), 6722-6733

407 **Ruiz-Arguello, M.B., Basanez, G., Goni, F.M. and Alonso, A.** (1996) Different effects of enzyme-generated ceramides and diacylglycerols in

phospholipid membrane fusion and leakage. *J Biol Chem* 271 (43), 26616-26621

408 **Rykx, A., De Kimpe, L., Mikhalap, S., Vantus, T., Seufferlein, T., Vandenheede, J.R. and Van Lint, J.** (2003) Protein kinase D: a family affair. *FEBS Lett* 546 (1), 81-86

409 **Sakane, F., Yamada, K., Kanoh, H., Yokoyama, C. and Tanabe, T.** (1990) Porcine diacylglycerol kinase sequence has zinc finger and E-F hand motifs. *Nature* 344 (6264), 345-348

410 **Sakane, F., Yamada, K., Imai, S. and Kanoh, H.** (1991) Porcine 80-kDa diacylglycerol kinase is a calcium-binding and calcium/phospholipid-dependent enzyme and undergoes calcium-dependent translocation. *J Biol Chem* 266 (11), 7096-7100

411 **Sakane, F., Imai, S., Kai, M., Wada, I. and Kanoh, H.** (1996) Molecular cloning of a novel diacylglycerol kinase isozyme with a pleckstrin homology domain and a C-terminal tail similar to those of the EPH family of protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271 (14), 8394-8401

412 **Sakane, F., Kai, M., Wada, I., Imai, S. and Kanoh, H.** (1996) The C-terminal part of diacylglycerol kinase alpha lacking zinc fingers serves as a catalytic domain. *Biochem J* 318 (Pt 2), 583-590

413 **Sakane, F. and Kanoh, H.** (1997) Molecules in focus: diacylglycerol kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 29 (10), 1139-1143

414 **Sakane, F., Imai, S., Yamada, K., Murakami, T., Tsushima, S. and Kanoh, H.** (2002) Alternative splicing of the human diacylglycerol kinase delta gene generates two isoforms differing in their expression patterns and in regulatory functions. *J Biol Chem* 277 (45), 43519-43526

415 **Salman, M. and Pagano, R.E.** (1997) Use of a fluorescent analog of CDP-DAG in human skin fibroblasts: characterization of metabolism, distribution, and application to studies of phosphatidylinositol turnover. *J Lipid Res* 38 (3), 482-490

416 **Sanjuan, M.A., Jones, D.R., Izquierdo, M. and Merida, I.** (2001) Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling. *J Cell Biol* 153 (1), 207-220

417 **Sanjuan, M.A., Pradet-Balade, B., Jones, D.R., Martinez, A.C., Stone, J.C., Garcia-Sanz, J.A. and Merida, I.** (2003) T cell activation in vivo targets diacylglycerol kinase alpha to the membrane: a novel mechanism for Ras attenuation. *J Immunol* 170 (6), 2877-2883

418 **Santos, T., Carrasco, S., Jones, D.R., Merida, I. and Eguinoa, A.** (2002) Dynamics of diacylglycerol kinase zeta translocation in living T-cells. Study of the structural domain requirements for translocation and activity. *J Biol Chem* 277 (33), 30300-30309

419 **Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K. and Lai, F.A.** (2002) PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129 (15), 3533-3544

420 **Saurin, A.T., Pennington, D.J., Raat, N.J., Latchman, D.S., Owen, M.J. and Marber, M.S.** (2002) Targeted disruption of the protein kinase C epsilon gene abolishes the infarct size reduction that follows ischaemic preconditioning of isolated buffer-perfused mouse hearts. *Cardiovasc Res* 55 (3), 672-680

421 **Schaap, D., van der Wal, J., van Blitterswijk, W.J., van der Bend, R.L. and Ploegh, H.L.** (1993) Diacylglycerol kinase is phosphorylated in vivo upon stimulation of the epidermal growth factor receptor and serine/threonine kinases, including protein kinase C-epsilon. *Biochem J* 289 (Pt 3), 875-881

422 **Schechtman, D. and Mochly-Rosen, D.** (2001) Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene* 20 (44), 6339-6347

423 **Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A.V., Witke, W., Huttner, W.B. and Soling, H.D.** (1999) Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401 (6749), 133-141

424 **Schroder, A.J., Quehl, P., Muller, J. and Samstag, Y.** (2000) Conversion of p56(lck) to p60(lck) in human peripheral blood T lymphocytes is dependent on co-stimulation through accessory receptors: involvement of phospholipase C, protein kinase C and MAP-kinases in vivo. *Eur J Immunol* 30 (2), 635-643

425 **Sciorra, V.A. and Morris, A.J.** (1999) Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 10 (11), 3863-3876

426 **Sciorra, V.A. and Morris, A.J.** (2002) Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling. *Biochim Biophys Acta* 1582 (1-3), 45-51

427 **Seelig, H.P., Schranz, P., Schroter, H., Wiemann, C., Griffiths, G. and Renz, M.** (1994) Molecular genetic analyses of a 376-kilodalton Golgi complex membrane protein (giantin). *Mol Cell Biol* 14 (4), 2564-2576

428 **Sharkey, N.A., Leach, K.L. and Blumberg, P.M.** (1984) Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (2), 607-610

429 **Shemesh, T., Luini, A., Malhotra, V., Burger, K.N. and Kozlov, M.M.** (2003) Prefission constriction of Golgi tubular carriers driven by local lipid metabolism: a theoretical model. *Biophys J* 85 (6), 3813-3827

430 **Shen, N., Guryev, O. and Rizo, J.** (2005) Intramolecular occlusion of the diacylglycerol-binding site in the C1 domain of munc13-1. *Biochemistry* 44 (4), 1089-1096

431 **Sheu, L., Pasyk, E.A., Ji, J., Huang, X., Gao, X., Varoqueaux, F., Brose, N. and Gaisano, H.Y.** (2003) Regulation of insulin exocytosis by Munc13-1. *J Biol Chem* 278 (30), 27556-27563

432 **Shindo, M., Irie, K., Ohigashi, H., Kuriyama, M. and Saito, N.** (2001) Diacylglycerol kinase gamma is one of the specific receptors of tumor-promoting phorbol esters. *Biochem Biophys Res Commun* 289 (2), 451-456

433 **Shindo, M., Irie, K., Nakahara, A., Ohigashi, H., Konishi, H., Kikkawa, U., Fukuda, H. and Wender, P.A.** (2001) Toward the identification of selective modulators of protein kinase C (PKC) isozymes: establishment of a binding assay for PKC isozymes using synthetic C1 peptide receptors and identification of the critical residues involved in the phorbol ester binding. *Bioorg Med Chem* 9 (8), 2073-2081

434 **Shindo, M., Irie, K., Masuda, A., Ohigashi, H., Shirai, Y., Miyasaka, K. and Saito, N.** (2003) Synthesis and phorbol ester binding of the cysteine-rich domains of diacylglycerol kinase (DGK) isozymes. DGKgamma and DGKbeta are new targets of tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 278 (20), 18448-18454

435 **Shirai, Y., Segawa, S., Kuriyama, M., Goto, K., Sakai, N. and Saito, N.** (2000) Subtype-specific translocation of diacylglycerol kinase alpha and gamma and its correlation with protein kinase C. *J Biol Chem* 275 (32), 24760-24766

436 **Shirakawa, R., Higashi, T., Tabuchi, A., Yoshioka, A., Nishioka, H., Fukuda, M., Kita, T. and Horiuchi, H.** (2004) Munc13-4 is a GTP-Rab27-binding protein regulating dense core granule secretion in platelets. *J Biol Chem* 279 (11), 10730-10737

437 **Siddhanta, A. and Shields, D.** (1998) Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J Biol Chem* 273 (29), 17995-17998

438 **Sidhu, R.S., Clough, R.R. and Bhullar, R.P.** (2005) Regulation of phospholipase C-delta1 through direct interactions with the small GTPase Ral and calmodulin. *J Biol Chem* 280 (23), 21933-21941

439 **Sidorenko, S.P., Law, C.L., Klaus, S.J., Chandran, K.A., Takata, M., Kurosaki, T. and Clark, E.A.** (1996) Protein kinase C mu (PKC mu) associates with the B cell antigen receptor complex and regulates lymphocyte signaling. *Immunity* 5 (4), 353-363

440 **Siliceo, M., Garcia-Bernal, D., Carrasco, S., Diaz-Flores, E., Leskow, F.C., Teixido, J., Kazanietz, M.G. and Merida, I.** (2006) Beta2-chimaerin provides a diacylglycerol-dependent mechanism for regulation of adhesion and chemotaxis of T cells. *J Cell Sci* 119

441 **Singer, W.D., Brown, H.A. and Sternweis, P.C.** (1997) Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu Rev Biochem* 66, 475-509

442 **Sinnett-Smith, J., Zhukova, E., Hsieh, N., Jiang, X. and Rozengurt, E.** (2004) Protein kinase D potentiates DNA synthesis induced by Gq-coupled receptors by increasing the duration of ERK signaling in swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 279 (16), 16883-16893

443 **Slack, B.E., Breu, J. and Wurtman, R.J.** (1991) Production of diacylglycerol by exogenous phospholipase C stimulates CTP:phosphocholine cytidylyltransferase activity and phosphatidylcholine synthesis in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 266 (36), 24503-24508

444 **Slater, S.J., Kelly, M.B., Taddeo, F.J., Rubin, E. and Stubbs, C.D.** (1994) Evidence for discrete diacylglycerol and phorbol ester activator sites on protein kinase C. Differences in effects of 1-alkanol inhibition, activation by phosphatidylethanolamine and calcium chelation. *J Biol Chem* 269 (25), 17160-17165

445 **Slater, S.J., Kelly, M.B., Taddeo, F.J., Ho, C., Rubin, E. and Stubbs, C.D.** (1994) The modulation of protein kinase C activity by membrane lipid bilayer structure. *J Biol Chem* 269 (7), 4866-4871

446 **Slater, S.J., Ho, C., Kelly, M.B., Larkin, J.D., Taddeo, F.J., Yeager, M.D. and Stubbs, C.D.** (1996) Protein kinase Calpha contains two activator binding sites that bind phorbol esters and diacylglycerols with opposite affinities. *J Biol Chem* 271 (9), 4627-4631

447 **Small, J.V., Geiger, B., Kaverina, I. and Bershadsky, A.** (2002) How do microtubules guide migrating cells? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (12), 957-964

448 **Sondermann, H., Soisson, S.M., Boykevisch, S., Yang, S.S., Bar-Sagi, D. and Kuriyan, J.** (2004) Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator Son of sevenless. *Cell* 119 (3), 393-405

449 **Song, C., Hu, C.D., Masago, M., Kariyai, K., Yamawaki-Kataoka, Y., Shibatohge, M., Wu, D., Satoh, T. and Kataoka, T.** (2001) Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras. *J Biol Chem* 276 (4), 2752-2757

450 **Spitaler, M. and Cantrell, D.A.** (2004) Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol* 5 (8), 785-790

451 **Springett, G.M., Bonham, L., Hummer, A., Linkov, I., Misra, D., Ma, C., Pezzoni, G., Di Giovine, S., Singer, J., Kawasaki, H., Spriggs, D., Soslow, R. and Dupont, J.** (2005) Lysophosphatidic acid acyltransferase-beta is a prognostic marker and therapeutic target in gynecologic malignancies. *Cancer Res* 65 (20), 9415-9425

452 **Sprong, H., van der Sluijs, P. and van Meer, G.** (2001) How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (7), 504-513

453 **Stahelin, R.V., Rafter, J.D., Das, S. and Cho, W.** (2003) The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C-alpha and group IVa cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 278 (14), 12452-12460

454 **Stahelin, R.V., Ananthanarayanan, B., Blatner, N.R., Singh, S., Bruzik, K.S., Murray, D. and Cho, W.** (2004) Mechanism of membrane binding of the phospholipase D1 PX domain. *J Biol Chem* 279 (52), 54918-54926

455 **Stahelin, R.V., Digman, M.A., Medkova, M., Ananthanarayanan, B., Melowic, H.R., Rafter, J.D. and Cho, W.** (2005) Diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Cepsilon: mechanistic differences between protein kinases Cdelta and Cepsilon. *J Biol Chem* 280 (20), 19784-19793

456 **Stahelin, R.V., Wang, J., Blatner, N.R., Rafter, J.D., Murray, D. and Cho, W.** (2005) The Origin of C1A-C2 Interdomain Interactions in Protein Kinase C{alpha}. *J Biol Chem* 280 (43), 36452-36463

457 **Stewart, S.J., Cunningham, G.R., Strupp, J.A., House, F.S., Kelley, L.L., Henderson, G.S., Exton, J.H. and Bocckino, S.B.** (1991) Activation of phospholipase D: a signaling system set in motion by perturbation of the T lymphocyte antigen receptor/CD3 complex. *Cell Regul* 2 (10), 841-850

458 **Stone, J.C., Stang, S.L., Zheng, Y., Dower, N.A., Brenner, S.E., Baryza, J.L. and Wender, P.A.** (2004) Synthetic bryostatin analogues activate the RasGRP1 signaling pathway. *J Med Chem* 47 (26), 6638-6644

459 **Stope, M.B., Vom Dorp, F., Szatkowski, D., Bohm, A., Keiper, M., Nolte, J., Oude Weernink, P.A., Rosskopf, D., Evellin, S., Jakobs, K.H. and Schmidt, M.** (2004) Rap2B-dependent stimulation of phospholipase C-epsilon by epidermal growth factor receptor mediated by c-Src phosphorylation of RasGRP3. *Mol Cell Biol* 24 (11), 4664-4676

460 **Storz, P., Doppler, H., Johannes, F.J. and Toker, A.** (2003) Tyrosine phosphorylation of protein kinase D in the pleckstrin homology domain leads to activation. *J Biol Chem* 278 (20), 17969-17976

461 **Storz, P. and Toker, A.** (2003) Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway. *Embo J* 22 (1), 109-120

462 **Storz, P., Doppler, H. and Toker, A.** (2004) Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling. *Mol Cell Biol* 24 (7), 2614-2626

463 **Su, T.T., Guo, B., Kawakami, Y., Sommer, K., Chae, K., Humphries, L.A., Kato, R.M., Kang, S., Patrone, L., Wall, R., Teitell, M., Leitges, M., Kawakami, T. and Rawlings, D.J.** (2002) PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling. *Nat Immunol* 3 (8), 780-786

464 **Sun, Z., Arendt, C.W., Ellmeier, W., Schaeffer, E.M., Sunshine, M.J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P.L. and Littman, D.R.** (2000) PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404 (6776), 402-407

465 **Swan, K.A., Alberola-Ila, J., Gross, J.A., Appleby, M.W., Forbush, K.A., Thomas, J.F. and Perlmutter, R.M.** (1995) Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes. *Embo J* 14 (2), 276-285

466 **Szallasi, Z., Bogi, K., Gohari, S., Biro, T., Acs, P. and Blumberg, P.M.** (1996) Non-equivalent roles for the first and second zinc fingers of protein kinase Cdelta. Effect of their mutation on phorbol ester-induced translocation in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 271 (31), 18299-18301

467 **Szule, J.A., Fuller, N.L. and Rand, R.P.** (2002) The effects of acyl chain length and saturation of diacylglycerols and phosphatidylcholines on membrane monolayer curvature. *Biophys J* 83 (2), 977-984

468 **Tabellini, G., Bortul, R., Santi, S., Riccio, M., Baldini, G., Cappellini, A., Billi, A.M., Berezney, R., Ruggeri, A., Cocco, L. and Martelli, A.M.** (2003) Diacylglycerol kinase-theta is localized in the speckle domains of the nucleus. *Exp Cell Res* 287 (1), 143-154

469 **Tabellini, G., Billi, A.M., Fala, F., Cappellini, A., Evagelisti, C., Manzoli, L., Cocco, L. and Martelli, A.M.** (2004) Nuclear diacylglycerol kinase-theta is activated in response to nerve growth factor stimulation of PC12 cells. *Cell Signal* 16 (11), 1263-1271

470 **Takahashi, H., Takeishi, Y., Seidler, T., Arimoto, T., Akiyama, H., Hozumi, Y., Koyama, Y., Shishido, T., Tsunoda, Y., Niizeki, T., Nozaki, N., Abe, J., Hasenfuss, G., Goto, K. and Kubota, I.** (2005) Adenovirus-mediated overexpression of diacylglycerol kinase-zeta inhibits endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation* 111 (12), 1510-1516

471 **Tall, E., Dorman, G., Garcia, P., Runnels, L., Shah, S., Chen, J., Profit, A., Gu, Q.M., Chaudhary, A., Prestwich, G.D. and Rebecchi, M.J.** (1997) Phosphoinositide binding specificity among phospholipase C isozymes as determined by photocross-linking to novel substrate and product analogs. *Biochemistry* 36 (23), 7239-7248

472 **Tan, I., Seow, K.T., Lim, L. and Leung, T.** (2001) Intermolecular and intramolecular interactions regulate catalytic activity of myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. *Mol Cell Biol* 21 (8), 2767-2778

473 **Tan, M., Xu, X., Ohba, M. and Cui, M.Z.** (2004) Angiotensin II-induced protein kinase D activation is regulated by protein kinase Cdelta and mediated via the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (12), 2271-2276

474 **Tang, W., Bunting, M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. and Prescott, S.M.** (1996) Molecular cloning of a novel human diacylglycerol kinase highly selective for arachidonate-containing substrates. *J Biol Chem* 271 (17), 10237-10241

475 **Teixeira, C., Stang, S.L., Zheng, Y., Beswick, N.S. and Stone, J.C.** (2003) Integration of DAG signaling systems mediated by PKC-dependent phosphorylation of RasGRP3. *Blood* 102 (4), 1414-1420

476 **Tesfai, Y., Brereton, H.M. and Barritt, G.J.** (2001) A diacylglycerol-activated Ca2+ channel in PC12 cells (an adrenal chromaffin cell line) correlates with expression of the TRP-6 (transient receptor potential) protein. *Biochem J* 358 (Pt 3), 717-726

477 **Thirugnanam, S., Topham, M.K. and Epand, R.M.** (2001) Physiological implications of the contrasting modulation of the activities of the epsilon- and zeta-isoforms of diacylglycerol kinase. *Biochemistry* 40 (35), 10607-10613

478 **Thompson, A.K., Mostafapour, S.P., Denlinger, L.C., Bleasdale, J.E. and Fisher, S.K.** (1991) The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration and phosphoinositide hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells. A role for Gp in receptor compartmentation. *J Biol Chem* 266 (35), 23856-23862

479 **Tognon, C.E., Kirk, H.E., Passmore, L.A., Whitehead, I.P., Der, C.J. and Kay, R.J.** (1998) Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain. *Mol Cell Biol* 18 (12), 6995-7008

480 **Tolias, K.F., Couvillon, A.D., Cantley, L.C. and Carpenter, C.L.** (1998) Characterization of a Rac1- and RhoGDI-associated lipid kinase signaling complex. *Mol Cell Biol* 18 (2), 762-770

481 **Tolias, K.F., Hartwig, J.H., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Cantley, L.C. and Carpenter, C.L.** (2000) Type Ialpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Curr Biol* 10 (3), 153-156

482 **Topham, M.K., Bunting, M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Blackshear, P.J. and Prescott, S.M.** (1998) Protein kinase C regulates the nuclear localization of diacylglycerol kinase-zeta. *Nature* 394 (6694), 697-700

483 **Topham, M.K. and Prescott, S.M.** (1999) Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. *J Biol Chem* 274 (17), 11447-11450

484 **Topham, M.K. and Prescott, S.M.** (2001) Diacylglycerol kinase zeta regulates Ras activation by a novel mechanism. *J Cell Biol* 152 (6), 1135-1143

485 **Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin,**

P., Boursier, E., Loriolle, F. and et al. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 266 (24), 15771-15781

486 **Trauzold, A., Schmiedel, S., Sipos, B., Wermann, H., Westphal, S., Roder, C., Klapper, W., Arlt, A., Lehnert, L., Ungefroren, H., Johannes, F.J. and Kalthoff, H.** (2003) PKCmu prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumour cells. *Oncogene* 22 (55), 8939-8947

487 **Truett, A.P., 3rd, Bocckino, S.B. and Murray, J.J.** (1992) Regulation of phosphatidic acid phosphohydrolase activity during stimulation of human polymorphonuclear leukocytes. *Faseb J* 6 (9), 2720-2725

488 **Truitt, K.E., Hicks, C.M. and Imboden, J.B.** (1994) Stimulation of CD28 triggers an association between CD28 and phosphatidylinositol 3-kinase in Jurkat T cells. *J Exp Med* 179 (3), 1071-1076

489 **Tsushima, S., Kai, M., Yamada, K., Imai, S., Houkin, K., Kanoh, H. and Sakane, F.** (2004) Diacylglycerol kinase gamma serves as an upstream suppressor of Rac1 and lamellipodium formation. *J Biol Chem* 279 (27), 28603-28613

490 **Valverde, A.M., Sinnett-Smith, J., Van Lint, J. and Rozengurt, E.** (1994) Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (18), 8572-8576

491 **van Baal, J., de Widt, J., Divecha, N. and van Blitterswijk, W.J.** (2005) Translocation of diacylglycerol kinase theta from cytosol to plasma membrane in response to activation of G protein-coupled receptors and protein kinase C. *J Biol Chem* 280 (11), 9870-9878

492 **van Blitterswijk, W.J. and Houssa, B.** (1999) Diacylglycerol kinases in signal transduction. *Chem Phys Lipids* 98 (1-2), 95-108

493 **van Blitterswijk, W.J. and Houssa, B.** (2000) Properties and functions of diacylglycerol kinases. *Cell Signal* 12 (9-10), 595-605

494 **Van de Ven, T.J., VanDongen, H.M. and VanDongen, A.M.** (2005) The nonkinase phorbol ester receptor alpha1-chimerin binds the NMDA receptor NR2A subunit and regulates dendritic spine density. *J Neurosci* 25 (41), 9488-9496

495 **Van Lint, J., Ni, Y., Valius, M., Merlevede, W. and Vandenheede, J.R.** (1998) Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase D through the activation of phospholipase Cgamma and protein kinase C. *J Biol Chem* 273 (12), 7038-7043

496 **Van Lint, J., Rykx, A., Maeda, Y., Vantus, T., Sturany, S., Malhotra, V., Vandenheede, J.R. and Seufferlein, T.** (2002) Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell Biol* 12 (4), 193-200

497 **Vantus, T., Vertommen, D., Saelens, X., Rykx, A., De Kimpe, L., Vancauwenbergh, S., Mikhalap, S., Waelkens, E., Keri, G., Seufferlein, T., Vandenabeele, P., Rider, M.H., Vandenheede, J.R. and Van Lint, J.** (2004) Doxorubicin-induced activation of protein kinase D1 through caspase-mediated proteolytic cleavage: identification of two cleavage sites by microsequencing. *Cell Signal* 16 (6), 703-709

498 **Varoqueaux, F., Sigler, A., Rhee, J.S., Brose, N., Enk, C., Reim, K. and Rosenmund, C.** (2002) Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (13), 9037-9042

499 **Varoqueaux, F., Sons, M.S., Plomp, J.J. and Brose, N.** (2005) Aberrant morphology and residual transmitter release at the Munc13-deficient mouse neuromuscular synapse. *Mol Cell Biol* 25 (14), 5973-5984

500 **Vega, R.B., Harrison, B.C., Meadows, E., Roberts, C.R., Papst, P.J., Olson, E.N. and McKinsey, T.A.** (2004) Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol Cell Biol* 24 (19), 8374-8385

501 **Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., Ochoa, W.F., Fita, I. and Gomez-Fernandez, J.C.** (1999) Ca(2+) bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase Calpha directly to phosphatidylserine. *Embo J* 18 (22), 6329-6338

502 **Verrier, E., Wang, L., Wadham, C., Albanese, N., Hahn, C., Gamble, J.R., Chatterjee, V.K., Vadas, M.A. and Xia, P.** (2004) PPARgamma agonists ameliorate endothelial cell activation via inhibition of diacylglycerol-protein kinase C signaling pathway: role of diacylglycerol kinase. *Circ Res* 94 (11), 1515-1522

503 **Vertommen, D., Rider, M., Ni, Y., Waelkens, E., Merlevede, W., Vandenheede, J.R. and Van Lint, J.** (2000) Regulation of protein kinase D by multisite phosphorylation. Identification of phosphorylation sites by mass

spectrometry and characterization by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 275 (26), 19567-19576

504 **Villalba, M., Bi, K., Hu, J., Altman, Y., Bushway, P., Reits, E., Neefjes, J., Baier, G., Abraham, R.T. and Altman, A.** (2002) Translocation of PKC[theta] in T cells is mediated by a nonconventional, PI3-K- and Vav-dependent pathway, but does not absolutely require phospholipase C. *J Cell Biol* 157 (2), 253-263

505 **Villar, A.V., Goni, F.M. and Alonso, A.** (2001) Diacylglycerol effects on phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and vesicle fusion. *FEBS Lett* 494 (1-2), 117-120

506 **Voet, D. and Voet, J.G.** (1995) *Biochemistry*, John Wiley & Sons, INC.

507 **Vogt, A.B., Spindeldreher, S. and Kropshofer, H.** (2002) Clustering of MHC-peptide complexes prior to their engagement in the immunological synapse: lipid raft and tetraspan microdomains. *Immunol Rev* 189, 136-151

508 **Wada, I., Kai, M., Imai, S., Sakane, F. and Kanoh, H.** (1996) Translocation of diacylglycerol kinase alpha to the nuclear matrix of rat thymocytes and peripheral T-lymphocytes. *FEBS Lett* 393 (1), 48-52

509 **Wakelam, M.J.** (1998) Diacylglycerol—when is it an intracellular messenger? *Biochim Biophys Acta* 1436 (1-2), 117-126

510 **Waldron, R.T., Iglesias, T. and Rozengurt, E.** (1999) The pleckstrin homology domain of protein kinase D interacts preferentially with the eta isoform of protein kinase C. *J Biol Chem* 274 (14), 9224-9230

511 **Waldron, R.T. and Rozengurt, E.** (2000) Oxidative stress induces protein kinase D activation in intact cells. Involvement of Src and dependence on protein kinase C. *J Biol Chem* 275 (22), 17114-17121

512 **Waldron, R.T. and Rozengurt, E.** (2003) Protein kinase C phosphorylates protein kinase D activation loop Ser744 and Ser748 and releases autoinhibition by the pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 278 (1), 154-163

513 **Walker, A.J., Draeger, A., Houssa, B., van Blitterswijk, W.J., Ohanian, V. and Ohanian, J.** (2001) Diacylglycerol kinase theta is translocated and phosphoinositide 3-kinase-dependently activated by noradrenaline but not angiotensin II in intact small arteries. *Biochem J* 353 (Pt 1), 129-137

514 **Wang, H. and Kazanietz, M.G.** (2002) Chimaerins, novel non-protein kinase C phorbol ester receptors, associate with Tmp21-I (p23): evidence for a novel anchoring mechanism involving the chimaerin C1 domain. *J Biol Chem* 277 (6), 4541-4550

515 **Wang, Q.J., Fang, T.W., Nacro, K., Marquez, V.E., Wang, S. and Blumberg, P.M.** (2001) Role of hydrophobic residues in the C1b domain of protein kinase C delta on ligand and phospholipid interactions. *J Biol Chem* 276 (22), 19580-19587

516 **Wang, Q.J., Fang, T.W., Yang, D., Lewin, N.E., Van Lint, J., Marquez, V.E. and Blumberg, P.M.** (2003) Ligand structure-activity requirements and phospholipid dependence for the binding of phorbol esters to protein kinase D. *Mol Pharmacol* 64 (6), 1342-1348

517 **Wang, S., Gebre-Medhin, S., Betsholtz, C., Stalberg, P., Zhou, Y., Larsson, C., Weber, G., Feinstein, R., Oberg, K., Gobl, A. and Skogseid, B.** (1998) Targeted disruption of the mouse phospholipase C beta3 gene results in early embryonic lethality. *FEBS Lett* 441 (2), 261-265

518 **Wang, Y., Waldron, R.T., Dhaka, A., Patel, A., Riley, M.M., Rozengurt, E. and Colicelli, J.** (2002) The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins. *Mol Cell Biol* 22 (3), 916-926

519 **Warrick, H.M. and Spudich, J.A.** (1988) Codon preference in Dictyostelium discoideum. *Nucleic Acids Res* 16 (14A), 6617-6635

520 **Watanabe, H., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Miyazaki, H., Sasaki, T., Maehama, T., Itoh, K., Frohman, M.A. and Kanaho, Y.** (2004) Essential role for phospholipase D2 activation downstream of ERK MAP kinase in nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth from PC12 cells. *J Biol Chem* 279 (36), 37870-37877

521 **Weigert, R., Silletta, M.G., Spano, S., Turacchio, G., Cericola, C., Colanzi, A., Senatore, S., Mancini, R., Polishchuk, E.V., Salmona, M., Facchiano, F., Burger, K.N., Mironov, A., Luini, A. and Corda, D.** (1999) CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid. *Nature* 402 (6760), 429-433

522 **Werlen, G., Hausmann, B. and Palmer, E.** (2000) A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* 406 (6794), 422-426

523 **Westermark, B., Siegbahn, A., Heldin, C.H. and Claesson-Welsh, L.** (1990) B-type receptor for platelet-derived growth factor mediates a

chemotactic response by means of ligand-induced activation of the receptor protein-tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1), 128-132

524 **Whitehead, I., Kirk, H., Tognon, C., Trigo-Gonzalez, G. and Kay, R.** (1995) Expression cloning of lfc, a novel oncogene with structural similarities to guanine nucleotide exchange factors and to the regulatory region of protein kinase C. *J Biol Chem* 270 (31), 18388-18395

525 **Wilkinson, S., Paterson, H.F. and Marshall, C.J.** (2005) Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat Cell Biol* 7 (3), 255-261

526 **Williams, J.G., Drugan, J.K., Yi, G.S., Clark, G.J., Der, C.J. and Campbell, S.L.** (2000) Elucidation of binding determinants and functional consequences of Ras/Raf-cysteine-rich domain interactions. *J Biol Chem* 275 (29), 22172-22179

527 **Winkler, D.G., Cutler, R.E., Jr., Drugan, J.K., Campbell, S., Morrison, D.K. and Cooper, J.A.** (1998) Identification of residues in the cysteine-rich domain of Raf-1 that control Ras binding and Raf-1 activity. *J Biol Chem* 273 (34), 21578-21584

528 **Wong, C. and Jin, Z.G.** (2005) Protein kinase C-dependent protein kinase D activation modulates ERK signal pathway and endothelial cell proliferation by vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 280 (39), 33262-33269

529 **Wood, C.D., Marklund, U. and Cantrell, D.A.** (2005) Dual phospholipase C/diacylglycerol requirement for protein kinase D1 activation in lymphocytes. *J Biol Chem* 280 (7), 6245-6251

530 **Woods, A.J., White, D.P., Caswell, P.T. and Norman, J.C.** (2004) PKD1/PKCmu promotes alphavbeta3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions. *Embo J* 23 (13), 2531-2543

531 **Xu, L., Frankel, P., Jackson, D., Rotunda, T., Boshans, R.L., D'Souza-Schorey, C. and Foster, D.A.** (2003) Elevated phospholipase D activity in H-Ras- but not K-Ras-transformed cells by the synergistic action of RalA and ARF6. *Mol Cell Biol* 23 (2), 645-654

532 **Xu, R.X., Pawelczyk, T., Xia, T.H. and Brown, S.C.** (1997) NMR structure of a protein kinase C-gamma phorbol-binding domain and study of protein-lipid micelle interactions. *Biochemistry* 36 (35), 10709-10717

533 **Yaffe, M.B., Leparc, G.G., Lai, J., Obata, T., Volinia, S. and Cantley, L.C.** (2001) A motif-based profile scanning approach for genome-wide prediction of signaling pathways. *Nat Biotechnol* 19 (4), 348-353

534 **Yakubchyk, Y., Abramovici, H., Maillet, J.C., Daher, E., Obagi, C., Parks, R.J., Topham, M.K. and Gee, S.H.** (2005) Regulation of neurite outgrowth in N1E-115 cells through PDZ-mediated recruitment of diacylglycerol kinase zeta. *Mol Cell Biol* 25 (16), 7289-7302

535 **Yamada, K., Sakane, F. and Kanoh, H.** (1989) Immunoquantitation of 80 kDa diacylglycerol kinase in pig and human lymphocytes and several other cells. *FEBS Lett* 244 (2), 402-406

536 **Yamada, K., Sakane, F., Imai, S. and Takemura, H.** (1993) Sphingosine activates cellular diacylglycerol kinase in intact Jurkat cells, a human T-cell line. *Biochim Biophys Acta* 1169 (3), 217-224

537 **Yamada, K., Sakane, F., Matsushima, N. and Kanoh, H.** (1997) EF-hand motifs of alpha, beta and gamma isoforms of diacylglycerol kinase bind calcium with different affinities and conformational changes. *Biochem J* 321 (Pt 1), 59-64

538 **Yamada, K., Sakane, F., Imai, S., Tsushima, S., Murakami, T. and Kanoh, H.** (2003) Regulatory role of diacylglycerol kinase gamma in macrophage differentiation of leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 305 (1), 101-107

539 **Yamamoto, K., Ishii, E., Sako, M., Ohga, S., Furuno, K., Suzuki, N., Ueda, I., Imayoshi, M., Yamamoto, S., Morimoto, A., Takada, H., Hara, T., Imashuku, S., Sasazuki, T. and Yasukawa, M.** (2004) Identification of novel MUNC13-4 mutations in familial haemophagocytic lymphohistiocytosis and functional analysis of MUNC13-4-deficient cytotoxic T lymphocytes. *J Med Genet* 41 (10), 763-767

540 **Yamashita, A., Sugiura, T. and Waku, K.** (1997) Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. *J Biochem (Tokyo)* 122 (1), 1-16

541 **Yamashita, S., Mochizuki, N., Ohba, Y., Tobiume, M., Okada, Y., Sawa, H., Nagashima, K. and Matsuda, M.** (2000) CalDAG-GEFIII activation of Ras, R-ras, and Rap1. *J Biol Chem* 275 (33), 25488-25493

542 **Yang, C. and Kazanietz, M.G.** (2003) Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends Pharmacol Sci* 24 (11), 602-608

543 **Yang, C., Liu, Y., Leskow, F.C., Weaver, V.M. and Kazanietz, M.G.** (2005) Rac-GAP-dependent inhibition of breast cancer cell proliferation by {beta}2-chimerin. *J Biol Chem* 280 (26), 24363-24370

544 **Yang, Y., Li, L., Wong, G.W., Krilis, S.A., Madhusudhan, M.S., Sali, A. and Stevens, R.L.** (2002) RasGRP4, a new mast cell-restricted Ras guanine nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. Identification of defective variants of this signaling protein in asthma, mastocytosis, and mast cell leukemia patients and demonstration of the importance of RasGRP4 in mast cell development and function. *J Biol Chem* 277 (28), 25756-25774

545 **Yao, L., Huang, D.Y., Pfaff, I.L., Nie, X., Leitges, M. and Vallon, V.** (2004) Evidence for a role of protein kinase C-alpha in urine concentration. *Am J Physiol Renal Physiol* 287 (2), F299-304

546 **Yeaman, C., Ayala, M.I., Wright, J.R., Bard, F., Bossard, C., Ang, A., Maeda, Y., Seufferlein, T., Mellman, I., Nelson, W.J. and Malhotra, V.** (2004) Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* 6 (2), 106-112

547 **Yokozeki, T., Kuribara, H., Katada, T., Touhara, K. and Kanaho, Y.** (1996) Partially purified RhoA-stimulated phospholipase D activity specifically binds to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurochem* 66 (3), 1234-1239

548 **Yuan, J., Bae, D., Cantrell, D., Nel, A.E. and Rozengurt, E.** (2002) Protein kinase D is a downstream target of protein kinase Ctheta. *Biochem Biophys Res Commun* 291 (3), 444-452

549 **Yuan, S., Miller, D.W., Barnett, G.H., Hahn, J.F. and Williams, B.R.** (1995) Identification and characterization of human beta 2-chimaerin: association with malignant transformation in astrocytoma. *Cancer Res* 55 (15), 3456-3461

550 **Zhang, G., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M. and Hurley, J.H.** (1995) Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell* 81 (6), 917-924

551 **Zhang, N., Zhang, J., Cheng, Y. and Howard, K.** (1996) Identification and genetic analysis of wunen, a gene guiding Drosophila melanogaster germ cell migration. *Genetics* 143 (3), 1231-1241

552 **Zhang, N., Zhang, J., Purcell, K.J., Cheng, Y. and Howard, K.** (1997) The Drosophila protein Wunen repels migrating germ cells. *Nature* 385 (6611), 64-67

553 **Zhao, Z.S. and Manser, E.** (2005) PAK and other Rho-associated kinases—effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J* 386 (Pt 2), 201-214

554 **Zheng, Y., Liu, H., Coughlin, J., Zheng, J., Li, L. and Stone, J.C.** (2005) Phosphorylation of RasGRP3 on threonine 133 provides a mechanistic link between PKC and Ras signaling systems in B cells. *Blood* 105 (9), 3648-3654

555 **Zhong, X.P., Hainey, E.A., Olenchock, B.A., Zhao, H., Topham, M.K. and Koretzky, G.A.** (2002) Regulation of T cell receptor-induced activation of the Ras-ERK pathway by diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem* 277 (34), 31089-31098

556 **Zhong, X.P., Hainey, E.A., Olenchock, B.A., Jordan, M.S., Maltzman, J.S., Nichols, K.E., Shen, H. and Koretzky, G.A.** (2003) Enhanced T cell responses due to diacylglycerol kinase zeta deficiency. *Nat Immunol* 4 (9), 882-890

557 **Zhou, Y., Wing, M.R., Sondek, J. and Harden, T.K.** (2005) Molecular cloning and characterization of phospholipase C-eta2. *Biochem J*

558 **Zhumabekov, T., Corbella, P., Tolaini, M. and Kioussis, D.** (1995) Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice. *J Immunol Methods* 185 (1), 133-140

559 **Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F. and Daum, G.** (1991) Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote Saccharomyces cerevisiae. *J Bacteriol* 173 (6), 2026-2034

560 **Zugaza, J.L., Sinnett-Smith, J., Van Lint, J. and Rozengurt, E.** (1996) Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway. *Embo J* 15 (22), 6220-6230

561 **Zwartkruis, F.J., Wolthuis, R.M., Nabben, N.M., Franke, B. and Bos, J.L.** (1998) Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signalling. *Embo J* 17 (20), 5905-5912

ANEXO

- Cipres A, Carrasco S, Merida I.
  Deletion of the acidic-rich domain of the IL-2Rbeta chain increases receptor-associated PI3K activity.
  FEBS Lett. 2001 Jun 29; 500(1-2): 99-104.

- Santos T, Carrasco S, Jones DR, Merida I, Eguinoa A.
  Dynamics of diacylglycerol kinase zeta translocation in living T-cells. Study of the structural domain requirements for translocation and activity.
  J Biol Chem. 2002 Aug 16; 277(33): 30300-9.

- De La Roche MA, Smith JL, Rico M, Carrasco S, Merida I, Licate L, Cote GP, Egelhoff TT.
  Dictyostelium discoideum has a single diacylglycerol kinase gene with similarity to mammalian theta isoforms.
  Biochem J. 2002 Dec 15; 368(Pt 3): 809-15

- Cipres A, Carrasco S, Merino E, Diaz E, Krishna UM, Falck JR, Martinez-A C, Merida I.
  Regulation of diacylglycerol kinase alpha by phosphoinositide 3-kinase lipid products.
  J Biol Chem. 2003 Sep 12; 278(37): 35629-35.

- Carrasco S, Merida I.
  Diacylglycerol-dependent binding recruits PKCtheta and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes.
  Mol Biol Cell. 2004 Jun; 15(6): 2932-42.

- Siliceo M, García-Bernal D, Carrasco S, Díaz-Flores E,Teixido J, Kazanietz M and Merida I.
  Beta-2 chimaerin modulates CXCL12-dependent adhesion and chemotaxis in Jurkat T cells.
  J. Cell Science 2006; en prensa

FEBS 25008 FEBS Letters 500 (2001) 99–104

Deletion of the acidic-rich domain of the IL-2Rβ chain increases receptor-associated PI3K activity

Angel Ciprés, Silvia Carrasco, Isabel Mérida*

Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received 14 May 2001; accepted 30 May 2001

First published online 15 June 2001

Edited by Julio Celis

Abstract Interleukin-2 (IL-2) regulates the proliferation and homeostasis of lymphocytes through the coordinated activation of distinct signaling pathways. Deletion of the acidic-rich domain of the IL-2 receptor β chain (IL-2Rβ) prevents association of Src tyrosine kinases to the receptor, as well as IL-2-induced Akt activation. Cells bearing this deletion (BafβΔA) maintain full proliferation in response to IL-2 both in vivo and in vitro, suggesting that those pathways are dispensable for this important function of IL-2. In this study, we re-examined phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) activation in BafβΔA cells and found that, in BaF/3 IL-2RβΔA cells, deletion of the acidic domain induced constitutive activation of the receptor-associated PI3K activity. This, in turn, was responsible for the higher basal Akt activity observed in cells expressing this deletion. Based on these data, and since pharmacological abrogation of PI3K activity prevented IL-2-driven cell proliferation of BafβΔA cells, we conclude that the PI3K/Akt pathway is still functionally relevant in cells bearing this mutation. Moreover, we show that the PI3K-induced signals are, at least in part, responsible for c-myc expression. In conclusion, we have used this model to better identify those signals that are integral components of the molecular mechanisms responsible for IL-2-regulated cell proliferation.

Key words: Interleukin-2 receptor; Phosphatidylinositol-3 kinase; Src family tyrosine kinase; Signal transduction

1. Introduction

Interleukin-2 (IL-2) is a cytokine essential for the proliferation of activated T lymphocytes, through its binding to the heterotrimeric IL-2 receptor (IL-2R) [1]. This receptor is composed of three different molecules termed α, β and γ. IL-2 binding to the IL-2R induces the rapid heterotrimerization of the receptor molecules and consequent activation of tyrosine kinases of the Jak and Src families [2,3]; these, in turn, induce the association/activation of other signaling molecules to the IL-2R complex. The identification of the role of the different domains in the IL-2Rβ and γ chains involved in IL-2-regulated signaling has been made possible by the generation of cell lines bearing truncations and/or mutations of these receptor components. Early studies of the IL-2Rβ subunit indicated the existence of three distinct and well-defined subdomains, conserved in the human and mouse molecules, which are important for the activation of different signaling molecules [4]. The membrane proximal domain of IL-2Rβ, also called the S-domain, is essential for IL-2 action and is responsible for the association of Jak1 kinase [5–7]. The function of the other two regions seems less essential, since truncations of either domain do not impair IL-2-dependent proliferation [4]. The proline-rich region, also termed the H-region, contains the tyrosine residues responsible for recruiting Stat 5 and Tat 3 transcription factors [8]. The acidic-rich domain (A-domain) of IL-2Rβ comprises amino acids 314–381 and is responsible for direct association of Src family tyrosine kinases and Shc [9,10]. Cells expressing receptors with the A-domain deleted proliferate in response to IL-2, indicating that direct association of Src family tyrosine kinases is unnecessary for the mitogenic action of IL-2.

IL-2-induced activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) was demonstrated some time ago [11–13]. As is the case for other growth factor receptors, generation of 3′ phosphorylated lipids through PI3K activation is important for the IL-2-regulated cell cycle, as well as for IL-2 prevention of apoptosis [14]. The IL-2Rβ chain is essential for IL-2-induced PI3K activation [15], but the exact nature of the association/activation of this lipid kinase following IL-2 binding has not been fully determined. It has recently been demonstrated that the IL-2Rβ chain and Jak1 cooperate functionally in the association of the regulatory subunit of p85 [16]. In those studies, deletion of the A-domain was shown to prevent not only the phosphorylation on tyrosine residues of p85, but also Akt activation by IL-2 in cells expressing the deleted receptor. Proliferation of the cells expressing the A-deleted mutant suggested that IL-2-induced Akt activation was not required for IL-2 regulation of cell proliferation.

Given the relevance of the PI3K/Akt pathway in the control of cell proliferation by several mitogens in other systems, we decided that a more detailed examination was required of the IL-2 regulation of these pathways in cells expressing the A-mutant IL-2Rβ chain. Here we have investigated the consequences of IL-2Rβ chain A-domain deletion on IL-2 activation of the PI3K/Akt pathway. Our results indicate that deletion of the A-domain induces higher PI3K activity constitutively associated to the IL-2Rβ chain compared to that associated to wild type IL-2Rβ. Addition of IL-2 to cells expressing the mutant receptor diminished this activity, indicating that those mechanisms responsible for downregulation of this activity remained IL-2-regulated. Constitutive activation of PI3K induced, in turn, an increase in Akt activity in cells expressing the mutant receptor. Based on these studies,

*Corresponding author. Fax: (34)-91-372 0493.
E-mail: imerida@cnb.uam.es

0014-5793/01/$20.00 © 2001 Published by Elsevier Science B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.
PII: S0014-5793(01)02594-7

we conclude that deletion of the A-domain in IL-2Rβ alters the time course and intensity of PI3K/Akt pathway activation. Binding of the cytokine to the mutated receptor nonetheless regulates this important signaling pathway, suggesting that it is required for the correct delivery of IL-2 proliferative signals.

2. Materials and methods

2.1. Cells

Murine BaF/3 cells stably transfected with cDNA encoding either the wild type (Bafβwt) or the A-deleted form (BafβΔA) of human IL-2Rβ have been previously described [4]. Both cell lines were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, β-mercaptoethanol (50 μM), and either 50 U/ml of human recombinant IL-2 or 5% WEHI.3B cell-conditioned media and gentamicin (50 μg/ml). For analysis of IL-2-induced signals, cells in exponential growth were washed extensively to remove growth factors and resuspended in growth factor- and serum-free media (basal media) for 6 h to induce maximum synchronization. Cells were then stimulated with IL-2 (50 U/ml) for the times indicated in each experiment. Cell viability of synchronized cells was 95% in all experiments.

2.2. Reagents

Human recombinant IL-2 was from Hoffmann-La Roche (Nutley, NJ, USA), wortmannin was from Sigma (St. Louis, MO, USA), LY294002 was from Biomol Research Labs, Inc. (Plymouth Meeting, PA, USA). [γ-^{32}P]ATP and the ECL-Plus kit were from Amersham (Piscataway, NJ, USA). Anti-PI3K(p85), anti-Akt and anti-phosphotyrosine horseradish peroxidase (HRPO)-conjugated antibodies were from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA), anti-human IL-2Rβ chain was from Pharmingen (San Diego, CA, USA), anti-myc was from Oncogene (Boston, MA, USA).

2.3. Plasmids and transfections

The expression cDNA constructs pEF-IL-2Rβ and pEF-IL-2RβΔA were kindly donated by T. Taniguchi (University of Tokyo, Japan). Plasmids encoding the constitutively active form of PI3K (p110-CAAX) and Akt were a gift of J. Downward (ICRF, UK). The c-myc promoter-driven luciferase gene was a gift from K. Sugamura (Tohoku University, Japan). For transfection experiments, cells were electroporated as described [17].

2.4. Analysis of cell growth and apoptosis

The [^{3}H]thymidine incorporation assay was performed as described [15]. Briefly, cells were seeded in 96-well plates at an initial concentration of 10^5 cells/ml. After 16 h, cells were pulsed with 1 μCi of [^{3}H]thymidine for 6 h prior to harvest. For cell cycle analyses, the fluorescence of propidium iodide-stained DNA was quantitated on a per cell basis with an EPIC-XL flow cytofluorometer (Coulter, Hialeah, FL, USA).

2.5. Immunoprecipitation and immunoblotting

Immunoprecipitation and immunoblotting were carried out as described [15]. In brief, after stimulation, cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and resuspended in lysis buffer (1% Nonidet P-40 (NP-40), 50 mM Tris–HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 mM $Na_4P_2O_7$, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM PMSF, 10 μg/ml leupeptin and 10 μg/ml aprotinin). Cell lysates were cleared by centrifugation (12 000 rpm for 15 min) and the supernatants pre-cleared with an excess of protein Gamma Bind G-Protein Sepharose (Pharmacia). Pre-cleared lysates were incubated with the indicated antibodies and the immune complex precipitated with G-protein Sepharose. For c-myc detection, cells were collected, resuspended in hypotonic buffer (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 2.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.6% NP-40 and protease inhibitors) and incubated on ice for 15 min. Cell extracts were vortexed vigorously and centrifuged for 1 min. The supernatants were removed and ice-cold nuclear extract buffer (20 mM HEPES pH 7.9, 25% glycerol, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM DTT and protease inhibitors) was added to the pellets. Samples were rocked (15 min, 4°C), centrifuged for 5 min and the supernatants collected. For Western blot analysis, samples were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE), then transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Proteins were detected by incubation with the appropriate antibodies followed by anti-mouse or anti-rabbit HRPO-conjugated antibodies (Amersham) or G-protein–HRPO conjugate (Bio-Rad). Western blots were developed using ECL-Plus (Amersham) according to the manufacturer's instructions.

2.6. PI3K assay

The assay of PI3K activity in pellets was performed as described [12]. Briefly, immunoprecipitates were washed three times with lysis buffer, once with 0.5 M LiCl and three times with 50 mM Tris–HCl (pH 7.5), then resuspended in 20 μl of 50 mM Tris–HCl pH 7.5, containing PI micelles (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) at 0.2 mg/ml. Kinase reaction was initiated by addition of 10 μM [γ-^{32}P]ATP (10 μCi), 25 μM $MgCl_2$ and 20 μM unlabeled ATP and allowed to proceed at 25°C for 10 min. The reaction was terminated by addition of 100 μl of 1 M HCl and 200 μl of a methanol:chloroform mixture (1:1 v/v). The extracted phospholipids were resolved by thin layer chromatography (Silica Gel 60; Merck) on plates coated with 1% potassium oxalate and developed in chloroform:methanol:4.5 M ammonia (9:7:2 v/v/v), as described [12]. The radioactive products were visualized by autoradiography and quantified by scanning laser densitometry.

2.7. Immunoprecipitation and Akt kinase assay

IL-2-stimulated cells were lysed and Akt was immunoprecipitated with a specific antibody as described [17]. Pellets were washed twice with lysis buffer, twice with high salt buffer (0.1 M Tris–HCl pH 8, 0.5 M LiCl, 10 mM $MgCl_2$) and once with kinase buffer (50 mM Tris–HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$). The reaction was initiated by addition of 25 μl of the following mixture: 50 mM Tris–HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 25 μg histone H2B, 1 μM phosphokinase inhibitor (Sigma), 50 μM ATP and 5 μCi [γ-^{32}P]ATP. The reaction was continued for 30 min at 25°C and terminated by addition of 25 μl of Laemmli sample buffer. Samples were resolved in SDS–PAGE, and the radioactive products detected by autoradiography.

2.8. Luciferase assays

Bafβwt cells were transfected by electroporation with 30 μg each of plasmids encoding a constitutive active form of p110 (p110-CAAX) or Akt, together with pXLuc and GFP to evaluate the transfection efficiency. After 24 h in IL-3-supplemented medium, cells were washed twice with RPMI 1640 and incubated in basal medium at a final concentration of 5×10^6 cells/ml for 8 h, then lysed and assayed for luciferase activity. To test the effect of inhibitors, cells were electroporated with the pXLuc plasmid and incubated in complete medium plus or minus IL-2 (50 U/ml) in the presence of the PI3K inhibitor LY294002 (10 μM). Luciferase activity was determined 18 h after transfection.

3. Results

3.1. PI3K-specific inhibitors prevent IL-2-dependent proliferation in Bafβwt and BafβΔA cells

Our previous experiments and those of other laboratories indicated that PI3K activation is essential for IL-2-driven proliferation. Nonetheless, it has been shown that deletion of the A-domain not only abolishes association of Src family tyrosine kinases to the receptor, but also prevents IL-2-dependent activation of the PI3K-regulated serine–threonine kinase Akt [16]. We thus assessed the role of PI3K-regulated signaling pathways in IL-2-dependent proliferation by measuring [^{3}H]thymidine incorporation into cells stably transfected with the wild type IL-2Rβ chain (Bafβwt) or the A-region deletion mutant (BafβΔA), in the presence of a pharmacological inhibitor for this kinase. Treatment with the PI3K inhibitor wortmannin diminished proliferation of BafβΔA cells to the same extent (about 50%) as it blocked proliferation of cells expressing the wild type IL-2Rβ (Fig. 1).

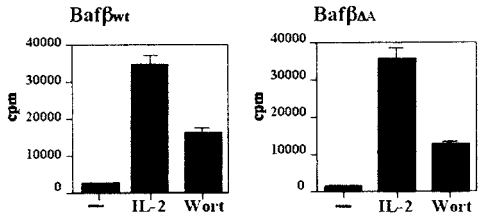


Fig. 1. Pharmacological inhibition of PI3K activity prevents IL-2-induced proliferation of Bafβwt and Bafβ∆A cells. Bafβwt or Bafβ∆A cells were synchronized in basal medium, then cultured in complete medium with or without IL-2 (50 U/ml). Where indicated, cells were preincubated with wortmannin (0.1 μM) for 1 h before IL-2 addition. Cell proliferation was determined by measuring [^{3}H]thymidine incorporation (see Section 2).

3.2. *A-domain deletion activates the PI3K/Akt pathway in the absence of IL-2*

Binding of IL-2 to its high affinity receptor is known to induce the transient activation of PI3K, which can be measured in immunoprecipitates of the IL-2Rβ protein. To determine the effect of the IL-2Rβ A-domain deletion on receptor-associated PI3K activity, we performed in vitro PI3K assays in immunoprecipitated IL-2Rβ molecules. As predicted, IL-2 increased the PI3K activity measured in immunoprecipitates of the IL-2Rβ chain (Fig. 2A). When Bafβ∆A cells were stimulated with IL-2, there was no apparent increase of IL-2Rβ-associated PI3K activity, but rather a decrease with respect to time zero was observed. We examined the lipid kinase activity associated with the receptor following more prolonged cell starvation and, surprisingly, found that the receptor-associated PI3K activity was higher when starvation time was increased (Fig. 2B). Consistent with this, in all experiments using Bafβ∆A cells, IL-2 was found to induce a rapid decrease of PI3K activity measured in receptor immunoprecipitates. Akt is a serine–threonine kinase that depends on 3′ phosphorylated lipids generation for activation. This protein kinase thus represents a reliable parameter for determining changes on PI3K activity. When a phosphorylation assay was performed in anti-Akt immunoprecipitates from Bafβwt cells after IL-2 stimulation, we found, as expected, IL-2-induced Akt activation (Fig. 2C). No similar effect was detected in cells expressing the A-deleted mutant. As was the case for receptor-associated PI3K, basal Akt activity was higher in cells expressing the A-deletion compared to that of cells expressing the wild type receptor. This suggests that the higher basal PI3K activity associated to the A-deleted IL-2Rβ chain induces an elevation in the basal Akt activity in these cells.

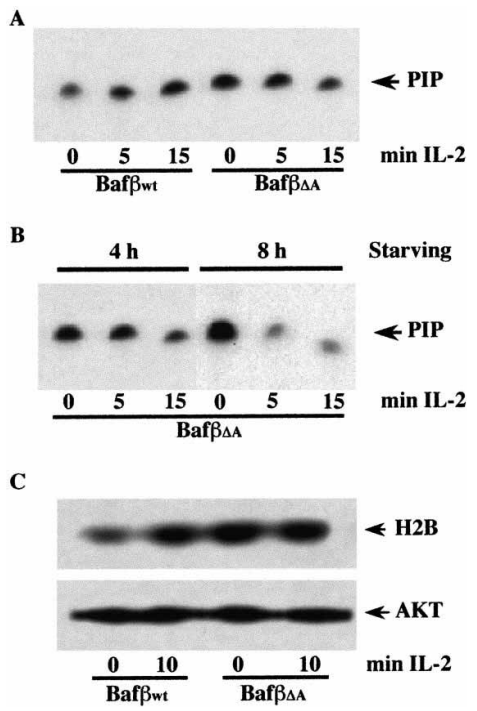


Fig. 2. Constitutive activation of receptor-associated PI3K/Akt activity in Bafβ∆A cells. (A) Synchronized Bafβwt or Bafβ∆A cells were stimulated with IL-2 for the times indicated. IL-2Rβ-associated PI3K activity was determined as described (Section 2). The figure shows [^{32}P]PI-3-phosphate production. (B) IL-2-induced PI3K activity was measured in Bafβ∆A immunoprecipitates following 4 or 8 h starvation in basal medium, as described for A. (C) Synchronized Bafβwt and Bafβ∆A cells were stimulated with IL-2 and Akt activity determined in immunoprecipitates (see Section 2).

3.3. *Transient expression of the IL-2Rβ∆A chain activates the PI3K/Akt pathway*

Bafβwt and Bafβ∆A are cell lines stably transfected with cDNA encoding the wild type β chain or bearing a deletion of the A-domain. To discard possible differences due to clonal variability between transfected cell lines, we also assessed both IL-2Rβ-associated PI3K activity and total Akt activity in cells transiently expressing both receptor forms. Parental cells were electroporated with plasmids encoding cDNA for both IL-2Rβwt and Bafβ∆A and analyzed 48 h after transfection. PI3K activity associated with IL-2Rβ∆A was high, and diminished following IL-2 addition (Fig. 3A). Moreover, the same cells had higher Akt activity than those expressing the IL-2Rβwt receptor counterpart. This confirms that the differences between receptor-associated PI3K and total Akt activity are a direct consequence of the deletion of the A-domain of the IL-2Rβ subunit.

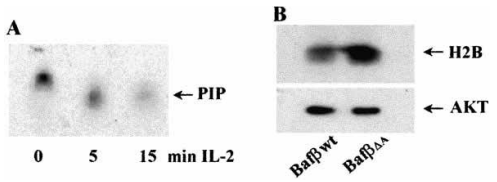


Fig. 3. PI3K/Akt activity is increased in BaF/3 cells transiently transfected with the A-domain deleted IL-2Rβ. (A) BaF/3 cells were transiently transfected with cDNA encoding the IL-2Rβ∆A chain. After transfection, cells were cultured in IL-3-conditioned medium for 24 h, synchronized in basal medium and IL-2-stimulated for the times indicated. IL-2Rβ-associated PI3K activity was determined as described. (B) IL-2Rβwt or IL-2Rβ∆A were transiently transfected into the BaF/3 cell line. Cells were cultured in IL-3-conditioned medium and synchronized in basal medium for 6 h, after which total Akt activity was determined as described.

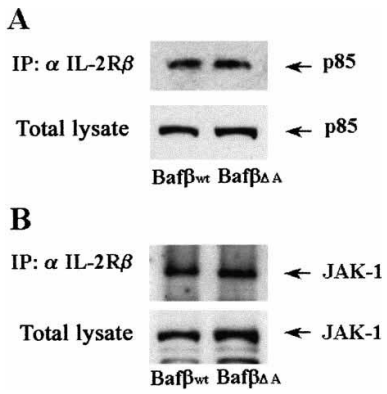


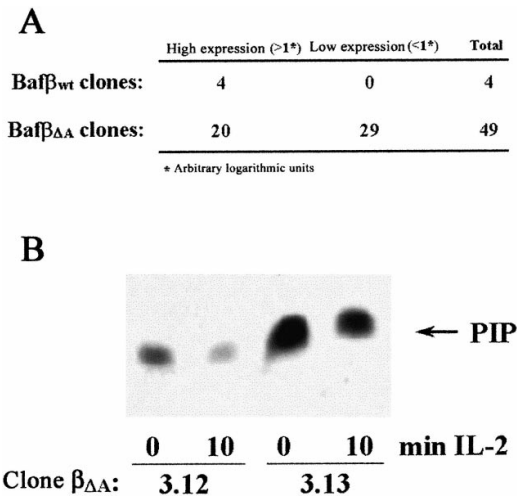
Fig. 4. Deletion of the A-domain has no effect on PI3K association to the IL-2Rβ. (A) BafBwt or BafBΔA cells were synchronized in basal medium for 6 h, lysed, and the PI3K associated to the IL-2Rβ chain determined by Western blot analysis of IL-2Rβ immunoprecipitates using an antibody specific for the PI3K regulatory subunit p85. 10% of the total cell lysates were also analyzed. (B) The same membranes as in A were reprobed for Jak1 association using a specific antibody.

3.4. *A-domain deletion does not affect PI3K association to the IL-2Rβ subunit*

Our experiments indicated that deletion of the IL-2Rβ A-domain induced elevated PI3K activity associated with the IL-2Rβ chain in the absence of cytokine stimulation. We therefore analyzed the consequence of this deletion on the basal constitutive association of this lipid kinase with the receptor. Using an antibody specific for p85, the regulatory subunit of PI3K, we found that A-domain deletion did not significantly alter the level of receptor-associated p85 (Fig. 4). As a control, the blots were reprobed with Jak1, the tyrosine kinase constitutively associated with the serine-rich domain of IL-2Rβ. These experiments allow us to conclude that the increased PI3K activity associated with the receptor bearing the A-domain deletion is not caused by greater association of the enzyme with the IL-2Rβ chain.

3.5. *A-domain deletion confers a survival advantage on transfected cells*

Activation of the PI3K/Akt pathway contributes to IL-2-regulated survival and proliferation mechanisms [18]. We reasoned that if deletion of the A-domain induced higher receptor-associated PI3K activity and this in turn increased basal Akt activity, cells expressing the mutated receptor would have a survival or proliferation advantage over cells expressing the wild type receptor. To test this hypothesis, we generated new clones of BaF/3 cells expressing either the wild type or the A-deleted IL-2Rβ chain. The total number of clones obtained for the IL-2RβΔA mutant was 10 times greater than that obtained for cells bearing the IL-2Rβwt (Fig. 5A). Moreover, in IL-2RβΔA cDNA-transfected cells, we consistently found a larger number of clones expressing low levels of the transfected β chain, whereas in the case of transfection with the wild type IL-2Rβ receptor, only cells expressing high levels of IL-2Rβwt molecules were obtained. To further demonstrate that the IL-2R-associated PI3K activity was constitutively higher, independently of the number of receptors expressed on the cell surface, we determined the lipid kinase activity in two clones expressing either high or low numbers of cell surface IL-2RβΔA. The behavior of both clones was similar,



A

	High expression (>1*)	Low expression (<1*)	Total
BafBwt clones:	4	0	4
BafBΔA clones:	20	29	49

* Arbitrary logarithmic units

Fig. 5. Transfection of the IL-2RβΔA confers a survival/proliferative advantage on BaF/3 cells. (A) BaF/3 cells were transfected with IL-2Rβwt or βΔA chains. Clonal selection of the cells was performed by limiting dilution; cells were cultured in complete medium with IL-2 (50 U/ml). The number of clones expressing high or low numbers of cell surface IL-2Rβ molecules is shown. (B) Two independent clones expressing low (3.12) or high (3.13) numbers of cell surface receptors were selected and IL-2Rβ-associated PI3K activity was determined as in Fig. 2.

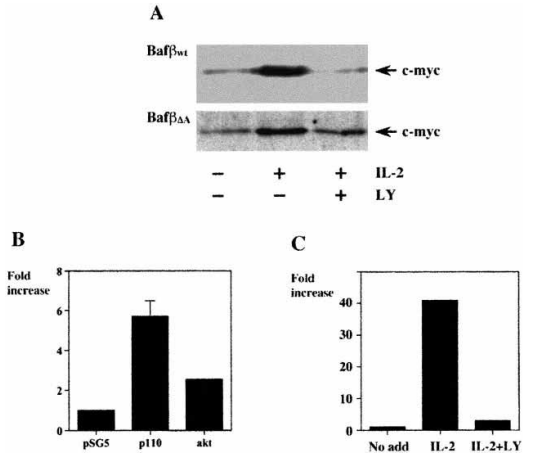


Fig. 6. Regulation of c-myc by the PI3K/Akt pathway. (A) After 4 h starvation in basal medium, cells were preincubated with the inhibitor LY292002 (10 μM) or vehicle, and stimulated with IL-2 for 2 h. Cells were collected, lysed, proteins resolved by SDS–PAGE and c-myc expression was analyzed by Western blot. (B) BafBwt cells were co-transfected with a c-myc promoter-driven luciferase gene and plasmids encoding a constitutive active form of PI3K (p110-CAAX) or wild type Akt. After transfection, cells were cultured in IL-3-conditioned medium for 24 h, followed by incubation in basal medium for an additional 8 h; luciferase activity was then determined. (C) BafBwt cells were transfected with the c-myc promoter-driven luciferase gene and cultured in complete medium with or without IL-2 (50 U/ml) for 18 h. The inhibitor LY292002 (LY, 10 μM) was added where indicated.

and in both cases IL-2 addition resulted in a decrease in the associated PI3K activity (Fig. 5B).

3.6. Involvement of PI3K-regulated pathways in c-myc induction

Activation of the PI3K/Akt pathway by growth factors has been shown to regulate several signals required for cell proliferation. Addition of IL-2 to lymphocytes results in the rapid expression of c-myc, and induction of this proto-oncogene is essential for IL-2-induced cell proliferation [28]. Pharmacological inhibition of PI3K prevents the induction of c-myc that follows IL-2 addition to both IL-2Rβwt and IL-2RβΔA cells (Fig. 6A). To further evaluate the role of the PI3K/Akt pathway on c-myc regulation, we examined the effect of constitutive activation of this pathway on the transcriptional regulation of the c-myc promoter. Overexpression of 3′ phosphorylated derivatives of PI or Akt overexpression are both sufficient to induce a detectable increase in the transcriptional activity of the c-myc promoter (Fig. 6B). Treatment of the cells with a pharmacological inhibitor of PI3K prevents IL-2 induction of the c-myc promoter (Fig. 6C). Taken together, these data demonstrate that PI3K regulation by IL-2 is essential for c-myc induction, confirming the importance of this lipid kinase in the control of proliferation.

4. Discussion

Activation of PI3K has been implicated in two important functions for IL-2, cell proliferation and prevention of apoptosis [14,18,19]. The lack of IL-2-induced Akt activation in cells transfected with the IL-2RβA deletion mutant suggested, however, that regulation of the PI3K/Akt pathway by IL-2 is not required for proliferation [16]. The detailed analysis, presented here, of the IL-2 regulation of PI3K-derived signals in BafβΔA cells, has allowed re-evaluation of the role of this pathway in IL-2-mediated proliferation. Deletion of the IL-2Rβ chain A-domain induces a concomitant increase in the PI3K activity constitutively associated to this molecule. This basal activation of the PI3K/Akt pathway is important for IL-2-induced cell proliferation, since inhibition of PI3K activity, either by addition of pharmacological inhibitors or following transfection of a construct with dominant negative properties (data not shown), has a profound effect on cell proliferation in response to this cytokine. These data confirm our previous observation [17] that an early increase in 3′ phosphorylated PI derivatives is necessary, but not sufficient, for IL-2-induced proliferation. Moreover, we demonstrate downregulation of receptor-associated PI3K activity in response to IL-2 addition, confirming that not only the activation, but also the downregulation of PI3K activity by IL-2-induced signals are important for cytokine-regulated cell proliferation. These data explain the lack of activation of the Akt pathway by IL-2 previously described in BafβΔA cells [16].

Our experiments demonstrate constitutive association of PI3K activity to the β subunit of the IL-2R. These results concur with recent studies by Migone et al., who showed that p85 associates to Jak1, which is in turn associated to the S-rich domain of IL-2Rβ [16]. In those studies, the authors elegantly demonstrated that the A-domain was required for a more effective association of p85 to the receptor, but the activity of the p85/p110 heterodimer was not investigated. The regulatory subunit of PI3K has been shown to negatively modulate the catalytic activity of p110 both in vitro and in vivo [20,21]. The activity of p85/p110 dimers is increased when the SH2 domains of p85 bind to phosphorylated residues in the proteins that contain the appropriate sequence motifs [22]. This suggests that the increased activity of the heterodimer when bound to phosphoproteins is not a true activation, but rather a disinhibition of the p85/p110 heterodimer. p85/p110 dimer activity may also be affected by other mechanisms, such as binding to GTP-bound ras and CDC42 [23,24], SH3 domain from Src family kinases [25] or proline-rich proteins that bind to the p85 SH3 domain [26]. Although not examined in detail, it would be interesting to determine whether activation of p85/p110 dimers in these cases also reflects a transition between inhibited and disinhibited states. Our experiments suggest that deletion of the A-rich domain of the IL-2Rβ chain induces disinhibition of the effect of the regulatory subunit on the p110 catalytic activity by a mechanism that remains to be defined.

We have shown that while activity of receptor-associated PI3K activity is enhanced in the absence of IL-2, addition of this cytokine to BafβΔA cells results in rapid downregulation of associated PI3K activity. Activation of PI3K in response to IL-2, as is the case for the majority of growth factor receptors, is rapid and transient, suggesting rapid downregulation of this activity following those signals responsible for PI3K association/activation. Although the mechanisms underlying PI3K activation in response to growth factors have been reviewed extensively, few data in the literature have addressed the downregulation of this activity. The recent discovery of the profound effect on cell transformation caused by mutations in the lipid phosphatase PTEN underlines the importance of a regulated balance, not only in the production but also in the degradation of 3-phosphorylated lipids for correct cell homeostasis [27]. This IL-2Rβ chain mutation represents an invaluable model to study the mechanisms by which IL-2 downregulates PI3K activity.

Activation of PI3K/Akt by IL-2 has been related to the anti-apoptotic effects of this cytokine [18]. Our experiments demonstrate that inhibition of PI3K prevents IL-2-regulated proliferation without affecting IL-2-induced survival, confirming our previous observation of the existence of alternative mechanisms of IL-2 protection from apoptosis [17]. IL-2-mediated expression of the cell cycle regulator E2F has been shown to be mediated by PI3K activity, suggesting that this pathway serves as a link between the IL-2R and the cell cycle machinery [14]. Here we show that IL-2-mediated PI3K activation can also regulate c-myc expression, suggesting the existence of multiple cell cycle control mechanisms regulated by IL-2R-triggered 3′ phosphorylated lipid products. Induction of c-myc has been demonstrated to be essential for IL-2-induced proliferation [28], nevertheless very little is known about the early signals that regulate IL-2-induced c-myc expression. Our experiments demonstrate for the first time a direct correlation between PI3K and c-myc induction.

The role of the A-domain deletion has recently been evaluated in primary lymphocyte populations through generation of mice expressing the IL-2RβA transgene on an IL-2Rβ null background [29]. T cells expressing the IL-2RβΔA mutant exhibited increased IL-2-mediated proliferation, indicating that the lack of this domain results in enhanced proliferation of primary T cells. This enhancement was accompanied by the prolonged phosphorylation of IL-2Rβ, suggesting that dele-

tion of the A-region results in the loss of signals involved in negative regulation. Examination of PI3K activity in these cells should provide further evidence of the role of these pathways in IL-2-mediated cell proliferation.

Acknowledgements: We are grateful to Dr. T. Taniguchi for reagents, suggestions and critical comments, to Drs. J. Downward, A. Carrera and K. Sugamura for the gift of reagents, and to Drs. D. Jones and E. Díez for critical reading of the manuscript. We thank Hoffmann-La Roche for the gift of recombinant human IL-2. This work was partially supported by Grants PM97-0132 from the Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica and 08.3/0016.1/99 from CAM to I.M. The Department of Immunology and Oncology was founded and is supported by the Spanish National Research Council (CSIC) and the Pharmacia Corporation.

References

[1] Taniguchi, T. and Minami, Y. (1993) Cell 73, 5–8.
[2] Miyazaki, T., Kawahara, A., Fuji, H., Nakagawa, Y., Minami, Y., Liu, Z.J., Oishi, I., Silvennoinen, O., Wittuhn, B. and Ihle, J. (1994) Science 266, 1045–1047.
[3] Taniguchi, T., Miyazaki, T., Minami, Y., Kawahara, A., Fujii, H., Nakagawa, Y., Hakateyama, M. and Liu, Z.J. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 766, 235–244.
[4] Hakateyama, M., Mori, H., Doi, T. and Taniguchi, T. (1989) Cell 59, 837–845.
[5] Leonard, W.J., Noguchi, M., Russell, S.M. and McBride, O.W. (1994) Immunol. Rev. 138, 61–86.
[6] Ihle, J.N. (1995) Nature 377, 591–594.
[7] Taniguchi, T. (1995) Science 268, 251–253.
[8] Fujii, H., Nakagawa, Y., Schindler, U., Kawahara, A., Mori, H., Gouilleux, F., Groner, B., Ihle, J.N., Minami, Y. and Miyazaki, T. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5482–5486.
[9] Friedmann, M.C., Migone, T.S., Russell, S.M. and Leonard, W.J. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 2077–2082.
[10] Ravichandran, K.S., Igras, V., Shoelson, S.E., Fesik, S.W. and Burakoff, S.J. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5275–5280.
[11] Remillard, B., Petrillo, R., Maslinski, W., Tsudo, M., Strom, T.B., Cantley, L. and Varticovski, L. (1991) J. Biol. Chem. 256, 14167–14170.
[12] Mérida, I., Díez, E. and Gaulton, G.N. (1991) J. Immunol. 147, 2202–2207.
[13] Augustine, J.A., Sutor, R.L. and Abraham, R.T. (1991) Mol. Cell. Biol. 11, 4431–4440.
[14] Brennan, P., Babbage, J.W., Burgering, B.M.T., Groner, B., Reif, K. and Cantrell, D. (1997) Immunity 7, 679–689.
[15] Mérida, I., Williamson, P., Kuziel, W.A., Greene, W.C. and Gaulton, G.N. (1993) J. Biol. Chem. 268, 6765–6770.
[16] Migone, T., Rodig, S., Cacalano, N.A., Berg, M., Schreiber, R.D. and Leonard, W.J. (1998) Mol. Cell. Biol. 18, 6416–6422.
[17] Ciprés, A., Gala, S., Martínez-A, C., Mérida, I. and Williamson, P. (1999) Eur. J. Immunol. 29, 1157–1158.
[18] Parijs, L.V., Refaeli, Y., Lord, J.D., Nelson, B.H., Abbas, A.K. and Baltimore, D. (1999) Immunity 11, 281–288.
[19] Ahmed, N.N., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Chang, O.T. and Tsichlis, P.N. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3627–3632.
[20] Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G.A. and Backer, J.M. (1998) Mol. Cell. Biol. 18, 1379–1387.
[21] Ueki, K., Algenstaedt, P., Mauvais-Jarvis, F. and Kahn, R. (2000) Mol. Cell. Biol. 20, 8035–8046.
[22] Carpenter, L.C., Auger, K.R., Chanudhuri, M., Yoakim, M., Schaffhausen, B., Shoelshon, S. and Cantley, L.C. (1993) J. Biol. Chem. 268, 9478–9483.
[23] Rodríguez-Viciana, P., Warne, P.H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M.D. and Downward, J. (1996) EMBO J. 15, 2442–2451.
[24] Zheng, Y., Bagrdia, S. and Cerione, R. (1994) J. Biol. Chem. 269, 18727–18730.
[25] Pleiman, C.M., Hertz, W.M. and Cambier, J.C. (1994) Science 263, 1609–1612.
[26] Guinebault, C., Payastre, B., Racaud-Sultan, C., Mazarguil, H., Breton, M., Mauco, G., Plantavid, M. and Chap, H. (1995) J. Cell. Biol. 129, 831–842.
[27] Di Cristofano, A. and Pandolfi, P.P. (2000) Cell 100, 387–390.
[28] Shibuya, H., Yoneyama, M., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K. and Taniguchi, T. (1992) Cell 70, 57–67.
[29] Fujii, H., Ogasawara, K., Otsuka, H., Suzuki, M., Yamamura, K., Yokochi, T., Miyazaki, T., Suzuki, H., Mak, T.W., Taki, S. and Taniguchi, T. (1998) EMBO J. 17, 6551–6557.

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 277, No. 33, Issue of August 16, pp. 30300–30309, 2002
Printed in U.S.A.

Dynamics of Diacylglycerol Kinase ζ Translocation in Living T-cells

STUDY OF THE STRUCTURAL DOMAIN REQUIREMENTS FOR TRANSLOCATION AND ACTIVITY*[S]

Received for publication, January 30, 2002, and in revised form, May 14, 2002
Published, JBC Papers in Press, May 15, 2002, DOI 10.1074/jbc.M200999200

Teresa Santos‡, Silvia Carrasco§, David R. Jones¶, Isabel Mérida‖, and Alicia Eguinoa**

From the Department of Immunology and Oncology, National Center for Biotechnology, Campus de Cantoblanco, Madrid 28049, Spain

The diacylglycerol kinases (DGK) regulate diacylglycerol-based signals by phosphorylating this key lipid intermediate to phosphatidic acid. Here, we have investigated the spatial and temporal regulation of diacylglycerol kinase ζ (DGKζ) in living Jurkat T-cells expressing a muscarinic type I receptor. Using real time confocal videomicroscopy, we show the rapid translocation of a green fluorescent protein-tagged enzyme from the cytosol to the plasma membrane following receptor stimulation. The generation of a panel of truncations, deletions, and point mutations of the enzyme allowed us to examine the requirements of the different structural motifs for both activity and receptor-regulated translocation. The data show that DGKζ has strict requirements for intact zinc fingers and the conserved catalytic domain for full enzymatic activity. Protein kinase C-driven myristoylated alanine-rich C kinase substrate domain phosphorylation and intact zinc fingers are in turn essential for plasma membrane translocation. DGKζ does not translocate to the membrane following stimulation of the endogenous T-cell receptor, and our data demonstrate that the specificity in terms of receptor response is provided by the regulatory motifs present at the C-terminal domain of the protein. This is the first report that shows *in vivo* DGKζ translocation in response to agonist stimulation and establishes the role of the different domains in enzymatic activity and the selectivity of the response to receptors.

When agonists bind to their cellular receptors, an early signaling event is often the hydrolysis or modification of certain lipids present in cell membranes to produce second messengers. A well known signaling pathway is the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by phospholipase C enzymes to produce diacylglycerol (DAG)[1] and soluble phosphatidylinositol 1,4,5-triposphate (1). The DAG generated by this mechanism acts as a membrane recruitment signal and activator for a series of C1 domain-containing signaling proteins such as some PKC isoforms (2), UNC-13 (3), RasGRP (4), and chimerins (5). These molecules are key regulators of a broad array of cellular functions including proliferation, differentiation, and/or apoptosis. The correct activation of DAG-regulated enzymes requires signal termination that is provided by the conversion of this lipid to phosphatidic acid (PA) in a reaction catalyzed by diacylglycerol kinase (DGK) (6). As the number of PA-binding proteins continues to grow (7–18), a role for DGK-generated PA must also be considered. Because DGKs can remove a lipid messenger by creating another, the subcellular localization of these enzymes, together with their regulation in response to receptor stimulation, are anticipated to be vital for the correct onset of cellular responses.

To date, nine DGK isoforms have been found in mammalian tissues, and similar genes are present in plants (19), the nematode *Caenorhabditis elegans* (3, 20), and *Drosophila melanogaster* (21). Structurally, the DGKs contain at least two N-terminal, zinc finger-like, cysteine-rich domains (CRD) and a conserved catalytic domain. Most mammalian DGKs present other distinct homology domains that have been used to classify them into five subclasses. The presence of different domains and the distinct tissue distribution of DGKs suggest very precise regulation and specific functions for these proteins in different cell types (22).

Most DGKs are cytosolic enzymes, and translocation from the cytosol to other subcellular compartments appears to be a general mechanism for activation of this enzyme family. DGKζ, a type IV DGK, was originally cloned from human endothelial cell cDNA as well as from rat retina and brain (23, 24). Not having the restricted expression pattern described for other isoforms, DGKζ appears much more ubiquitous, and DGKζ RNA is abundant in tissues such as skeletal muscle and lymphoid cells. There are two class IV DGK isoforms (DGKζ and ι) that are characterized by a domain homologous to the myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS) protein phosphorylation domain, four C-terminal ankyrin repeats, and a PDZ-binding motif. Translocation of DGKζ from the cytosol to the nucleus is proposed to regulate cell growth by modulating nuclear DAG levels (25). More recently, it was

* This work was supported by Dirección General de Investigación/Ministerio Ciencia y Tecnologia Grant BMC2001-1066 and Comunidad de Madrid Grant 08.3/0022/2000. The Department of Immunology and Oncology was founded and is supported by the Spanish Council for Scientific Research (CSIC) and the Pharmacia Corporation. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[S] The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains Videos 1 and 2.

‡ Supported by the Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT) Mexico, and the Secretaria de Educacion Publica (SEP) Mexico.

§ Fellow of the Spanish Ministry of Education (MECyD).

¶ Present address: Division of Cellular Biochemistry. The Netherlands Cancer Institute, Plesmanlaan 121, 1066CX Amsterdam, The Netherlands.

‖ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-585-4849; Fax: 34-91-372-0493; E-mail: imerida@cnb.uam.es.

** Awardee of a contract from the Spanish Ministry of Science and Technology.

[1] The abbreviations used are: DAG, diacylglycerol; PKC, protein kinase C; PA, phosphatidic acid; DGK, diacylglycerol kinase; CRD, cysteine-rich domain; MARCKS, myristoylated alanine-rich C kinase substrate; TCR, T-cell receptor; GFP, green fluorescent protein; EGFP, enhanced GFP; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; CT, C-terminal domain; PBS, phosphate-buffered saline.

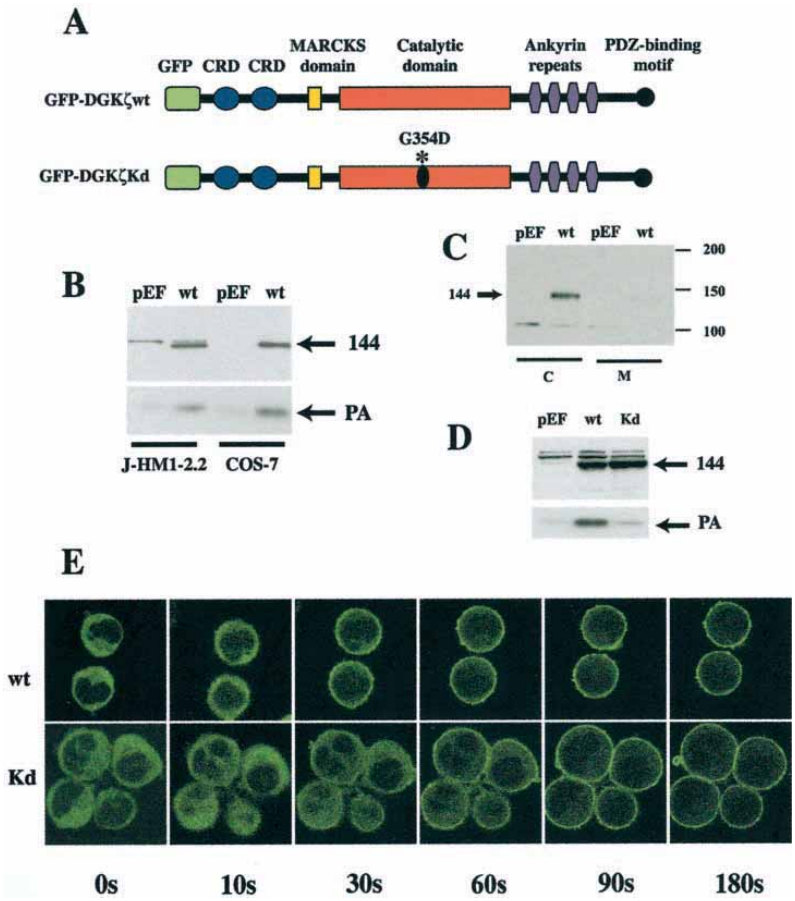


FIG. 1. **Properties of GFP chimeras of wild type and catalytically inactive DGKζ.** *A*, constructs of wild type (*wt*) and catalytically inactive (*Kd*) DGKζ fused to GFP. The conserved motifs of the enzyme are indicated. The conserved cluster (GGDG) in the catalytic domain in which Gly-354 was mutated to Asp is marked as a *black dot*. *B*, immunoblot analysis (*top*) and enzymatic activity (*bottom*) of proteins transiently expressed in J-HM1-2.2 and COS-7 cells. Analysis with anti-GFP antibody showed that expressed GFP-DGKζ (wt) was a 144-kD protein. DGK kinase activity of the protein expressed in both cell types was determined by an octyl glucoside mixed micelle assay. Phosphorylated phosphatidic acid was separated by TLC as described under "Experimental Procedures." The figure represents a typical experiment showing the autoradiogram of the TLC plate corresponding to the area of PA standard migration. *C*, cytosolic localization of GFP-DGKζ. J-HM1-2.2 cells were transiently transfected with empty vector (*pEF*) or GFP-DGKζ (*wt*) and lysed after 24 h. Cytosol (*C*) and membrane (*M*) fractions were prepared, and the same protein amounts from each fraction were resolved by SDS-PAGE. Expression of the transfected protein was analyzed by immunoblotting with anti-GFP antibodies. Similar findings were obtained in two separate experiments. *D*, protein expression and kinase activity of the GFP-DGKζ and GFP-DGKζ (*Kd*) mutant. Both proteins were transiently expressed in COS-7 cells, and protein expression and enzymatic activity were assayed as in *B*. *E*, time-lapse confocal imaging of the subcellular localization of GFP-DGKζwt or GFP-DGKζKd after carbachol stimulation. J-HM1-2.2 cells were transiently transfected with wt (*top*), or Kd (*bottom*) GFP-DGKζ; 24 h later they were plated on poly-L-lysine-coated coverslip chambers. Cells were mounted on a 37 °C plate on the confocal microscope and stimulated with 50 μM carbachol. The time-lapse movie sequences of GFP-DGKζwt and GFP-DGKζKd with images collected every 10 s are available as Videos 1 and 2 in the supplemental material. Images corresponding to the indicated times are shown.

shown that this enzyme can interact with and regulate either integral or plasma membrane-associated proteins such as the long form leptin receptor (26), syntrophin (27), and RasGRP (28).

Whereas the signaling functions of DGKζ as a DAG-driven signal attenuator are well characterized (25, 28), the mechanisms by which this enzyme is activated and gains access to its substrate remain undefined. Here, we studied the spatiotemporal regulation of DGKζ in T-lymphocytes following the stimulation of an ectopically expressed, G-coupled, muscarinic type I receptor known to mimic TCR responses (29, 30). In addition, we examined the requirements of each of the defined structural motifs for both enzymatic activity and translocation. GFP-tagged DGKζ translocates very rapidly from the cytosol to the plasma membrane in response to the addition of carbachol. Enzymatic activity is not required for movement toward the plasma membrane, whereas phosphorylation of the MARCKS domain is nonessential for enzyme activity but absolutely required for membrane localization. The protein does not translocate following TCR stimulation, indicating that phospholipase C-mediated DAG generation and PKC activation are not the only signals required for enzyme translocation. Deletion of the DGKζ C-terminal domain, which contains four ankyrin repeats and a PDZ-binding sequence, restores membrane translocation following TCR triggering, suggesting that these domains play a restrictive role in the regulation of membrane translocation. All together, these results demonstrate DGKζ translocation in living cells in response to G protein-coupled

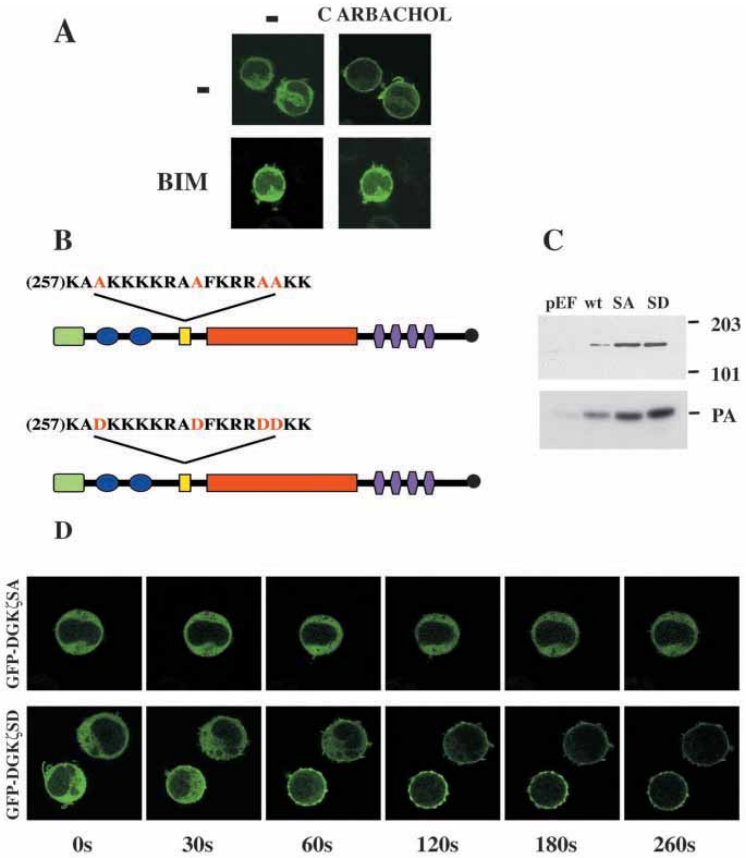


FIG. 2. **Phosphorylation of the MARCKS domain Ser residues is required for translocation.** *A*, PKC inhibition prevents carbachol-induced DGKζ translocation. Cells were transfected with GFP-DGKζ; 24 h later they were pretreated for 30 min with 100 nM bisindolylmaleimide or Me_2SO before carbachol stimulation for 5 min. The figure shows single confocal frames of cells. *B*, GFP-DGKζSA and GFP-DGKζSD constructs. In the SA mutant, MARCKS domain residues Ser-259, Ser-266, Ser-271, and Ser-272 were mutated to Ala. In the Ser → Asp mutant, the same Ser residues were mutated to Asp. *C*, mutations in the MARCKS domain have no effect on enzyme activity. COS-7 cells were transiently transfected with the constructs, and the molecular size of the expressed protein was analyzed by immunoblot with anti-GFP antibody (*top*). Kinase activity was determined in total cell lysates as in Fig. 1 (*bottom*). The figure represents a typical experiment showing the autoradiogram of the TLC plate corresponding to the area of PA standard migration. *D*, subcellular localization of GFP-DGKζSA and GFP-DGKζSD mutants after carbachol stimulation as determined by time-lapse confocal imaging. Cells were transiently transfected with GFP-DGKζSA or GFP-DGKζSD; 24 h later they were plated on poly-L-lysine-coated coverslip chambers in a HEPES-balanced salt solution. Cells were mounted on a 37 °C plate on the confocal microscope and stimulated with 50 μM carbachol. Images correspond to the indicated times after stimulation.

receptors and provide further insight into the role of the protein domains specific to this DGK isoform and those shared by all DGK family members.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—[γ-^{32}P]ATP was purchased from Amersham Biosciences, silica gel thin layer chromatography plates (60A LK6D) were from Whatman, and carbachol, orthovanadate, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1,2-dioctanoyl-*sn*-glycerol (DiC8), and poly-L-lysine were from Sigma. Leupeptin and aprotinin were from Roche Molecular Biochemicals, and *N*-octyl-β-D-glucopyranoside was from Calbiochem. Anti-GFP monoclonal antibody was purchased from CLONTECH, anti-CD28 antibody (Cat. 555725) was from BD PharMingen, and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG was from Dako. Polystyrene 15.0-μm microspheres were from Polysciences Inc. (Warrington, PA; catalog no. 18328).

Plasmids and DNA Constructs—Rat DGK-IV cDNA was a generous gift of K. Goto (Yamagata University School of Medicine, Sendai, Japan). pSREflagDGKIV was excised with *Eco*RI, and the 3.4-kb fragment encoding the DGK-IV cDNA was subcloned in the pcDNA3Myc vector (pCDNAMycDGK-IV). For expression experiments, all constructs were subcloned in the pEGFPBos vector in the GFP C terminus. For the MCA construct, pCDNA3MycDGKIV was digested with *Bst*XI/*Bgl*II, and the 2.2-kb fragment was subcloned in pEGFPBos. To generate the ankyrin domains deletion (ΔANK), pCMV3MycDGKIV was *Sac*I-digested, blunted, *Kpn*I-digested, and subcloned in pEGFPBos digested with *Kpn*I/*Sma*I. Site-directed mutagenesis was performed using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). To generate the kinase-dead version of the enzyme, Gly-354 was replaced with Asp as described (25). We designed two mutations in the MARCKS homology domain; in the first we replaced Ser-259, Ser-266, Ser-271, and Ser-272 with Ala (mutant Ser → Ala), and in the second the same residues were replaced with Asp (mutant Ser → Asp). To mutate the CRDs, the first conserved His in each of the two CRDs of the protein, His-98 or His-173, were replaced with Gly either in the wild type protein or in the Ser → Asp mutant. The C-terminal domain (CT) construct, including the four ankyrin repeats and the PDZ-binding motif, was generated by PCR with appropriate primers, which included two restriction sites, *Sal*I and *Xba*I. The PCR product was subcloned in the pGEM-T easy vector (Promega) and then excised with *Sal*I/*Xba*I to be subcloned in the expression vector pEFBosCX-HA, which was previously digested with *Sal*I/*Xba*I.

Cell Lines and Transient Transfections—COS-7 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 2 mM glutamine. For transfection, 60–80% confluent cells were transfected with LipofectAMINE (Invitrogen) ac-

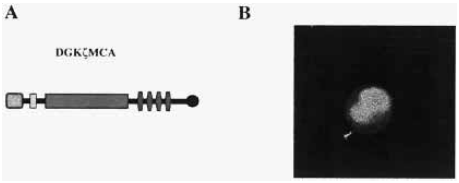


FIG. 3. **Effect of CRD deletion on DGKζ localization.** *A*, GFP-DGKζMCA construct used in these experiments was a GFP-DGKζ chimera bearing an N-terminal truncation that eliminated both CRDs. *B*, subcellular localization of the GFP-DGKζMCA mutant. J-HM1-2.2 cells were transfected; 24 h later, subcellular localization of the expressed protein was analyzed by confocal microscopy.

cording to the manufacturer's instructions. After 24 h cells were harvested, and each sample was divided into two pellets for immunoblot and a DAG activity assay. The J-HM1-2.2 cell line was generated by stable transfection of the human muscarinic subtype 1 receptor in the Jurkat cell line (29). Cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 2 mM glutamine. Cells (1.2×10^7) were transfected by electroporation with 20 μg of DNA using a Gene Pulser (Bio-Rad) at 270 V and a capacitance of 975 microfarads. Cells were immediately transferred to 30 ml of growth medium and assayed 24 h later.

Subcellular Fractionation—Cells were resuspended in an ice-cold hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.25 M sucrose) and incubated on ice for 15 min. Cells were lysed by being passed five times through a 30-gauge needle. The lysates were centrifuged at 800 × *g* for 10 min to remove nuclei and cell debris, and the supernatant was collected and centrifuged at 13,000 × *g* for 60 min at 4 °C. The supernatant (cytosol) and the pellet (membranes) were collected and separated by SDS-PAGE.

Western Blot—Cells were resuspended in lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 mM $Na_4P_2O_7$, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM PMSF, and 10 μg/ml each aprotinin and leupeptin) and incubated (15 min on ice). After centrifugation (15,000 × *g* for 15 min at 4 °C), the supernatants were assayed for total protein (DC protein assay, Bio-Rad), and an equivalent amount of protein of each sample was analyzed by SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose, and the expression of GFP-coupled constructs was determined with an anti-GFP monoclonal antibody and the ECL detection kit (Amersham Biosciences).

Diacylglycerol Kinase Activity Assay—The pellet of transfected COS-7 cells was resuspended in lysis buffer (50 mM Tris HCl, pH 7.4, 50 mM NaF, 10 μg/ml each leupeptin and aprotinin, 1 mM PMSF, and 1 mM sodium orthovanadate), lysed by sonication, and centrifuged (800 × *g*, 10 min). The supernatant was removed and assayed for total protein. An equivalent amount of protein from each sample was mixed with DAG as substrate in octyl glucoside, and ^{32}P incorporation into PA was measured. Samples were analyzed by thin layer chromatography using a chloroform, methanol, 4 M ammonia (v/v/v) (9:7:2) system. Plates were phosphorimaged in a Molecular Imager Personal FX (Bio-Rad).

Confocal Microscopy Imaging—At 24 h after transfection, J-HM1-2.2 cells were transferred to poly-L-lysine-coated chambered coverslips (LabTek), allowed to attach for at least 15 min at 37 °C, washed, and maintained in HEPES-balanced salt solution. Stimulus was added by replacing the supernatant with a fresh solution containing the appropriate concentration of each stimulant. Cells were imaged with a laser-scanning confocal microscope (TCS-NT, Leica). A 488-nm krypton-argon laser line was used for excitation, and a 530/30 barrier filter was used for emission. Time series of images were recorded before, during, and after stimulation of the cells.

Stimulation with Antibody-coated Microspheres—Antibodies were adsorbed to microspheres by mixing 0.5 μg of antibody in PBS at 0.5×10^6 microspheres in a final volume of 1 ml and incubating (1.5 h at room temperature) it with continuous mixing; 1.5 ml of 1% bovine serum albumin in PBS was then added and mixing continued (30 min). Microspheres were washed three times with PBS and resuspended in PBS for the addition to cells. For stimulation, 10^6 transfected J-HM1-2.2 cells were mixed with antibody-coated beads at a 2:1 cell/bead proportion and plated on chambered coverslips. Time series of images were captured by confocal microscopy.

RESULTS

Translocation of Wild Type and Catalytically Inactive DGKζ in Response to Carbachol—To study the subcellular localization and dynamics of DGKζ in live T-lymphocytes, we linked the cDNA of DGKζ to the EGFP C terminus (Fig. 1*A*) and expressed this construct (EGFP-DGKζ) in J-HM1-2.2 cells. This is a variant of the Jurkat cell line stably transfected with the human muscarinic type 1 receptor and has been used previously to examine the role of DAG on T-cell responses (29, 30). Transfection of this construct in J-HM1-2.2 and COS-7 cells induced the expression of a protein of the appropriate size with DGK activity in an *in vitro* assay (Fig. 1*B*). The transfected EGFP-DGKζ was found in the supernatant after high speed centrifugation of J-HM1-2.2 cells, suggesting a true cytosolic localization of the protein as opposed to localization to vesicular membrane compartments (Fig. 1*C*). Fluorescent images of live J-HM1-2.2 cells showed that the cytosolic EGFP-DGKζ translocated very rapidly and almost completely to the plasma membrane following carbachol stimulation (Fig. 1*E*, *top*). By ~90 s the majority of the protein was located at the plasma membrane, where it remained for at least 45 min after stimulation (see supplemental material, Video 1). We next analyzed whether membrane translocation required enzyme activity. To generate a DGKζ kinase-dead mutant, Gly-354 was mutated to Asp. This residue, which is found within the GGDG motif that is conserved in all DGK family members, has been shown to be essential for enzymatic activity (Fig. 1*A*). Mutation of this residue in the conserved cluster of the *D. melanogaster* DGKι induces retinal degeneration (21). Mutation of this same residue in human DGKζ has already been described as essential for enzyme activity (25). The loss of enzymatic activity by mutation of this conserved Gly is therefore a well established observation. As expected, expression of the EGFP-DGKζ (kinase-dead) mutant rendered a protein of the same weight average M_r as the wild type but with impaired activity (Fig. 1*D*). When examined by confocal videomicroscopy, the catalytically inactive mutant translocated to the membrane with the same kinetics as the wild type protein (Fig. 1*E*, *bottom* and supplemental material, Video 2).

Phosphorylation of the DGKζ MARCKS Domain Serine Residues Is Essential for Membrane Translocation—Type IV DGKs bear several domains with a potential role as regulators of enzyme activity and/or localization. One is a highly conserved sequence between the CRDs and the catalytic domain with a similarity to the basic effector domain in MARCKS. This sequence, when expressed in COS-7 cells, translocates between the nucleus and the cytosol in a PKC-dependent manner (25). We first determined the requirement for PKC activity in enzyme translocation using specific pharmacological inhibitors. The inhibition of PKC activity by bisindolylmaleimide treatment prevented DGKζ translocation, suggesting that protein relocation is highly dependent on PCK activation (Fig. 2*A*). We next generated mutants in which phosphorylation of the MARCKS domain was prevented (Ser → Ala; Fig. 2*B*) or mimicked (Ser → Asp; Fig. 2*B*). We verified that, when transfected, the mutants had the same weight average M_r as the wild type protein (Fig. 2*C*). None of the mutations affected enzyme activity, suggesting that the DGKζ MARCKS domain does not participate in DAG phosphorylation (Fig. 2*C*). Changes in the subcellular localization of the mutants following receptor stimulation was monitored in living J-HM1-2.2 cells. The mutation of Ser residues to Ala prevented translocation of the enzyme to the membrane in response to receptor stimulation (Fig. 2*D*, *top*). On the other hand, mutations that mimicked phosphorylation allowed protein translocation to the plasma membrane with kinetics similar to that of the wild type (Fig. 2*D*, *bottom*). We thus conclude that PKC-dependent protein phosphorylation of DGKζ at the MARCKS domain is an absolute requirement for protein translocation from the cytosol to the mem-

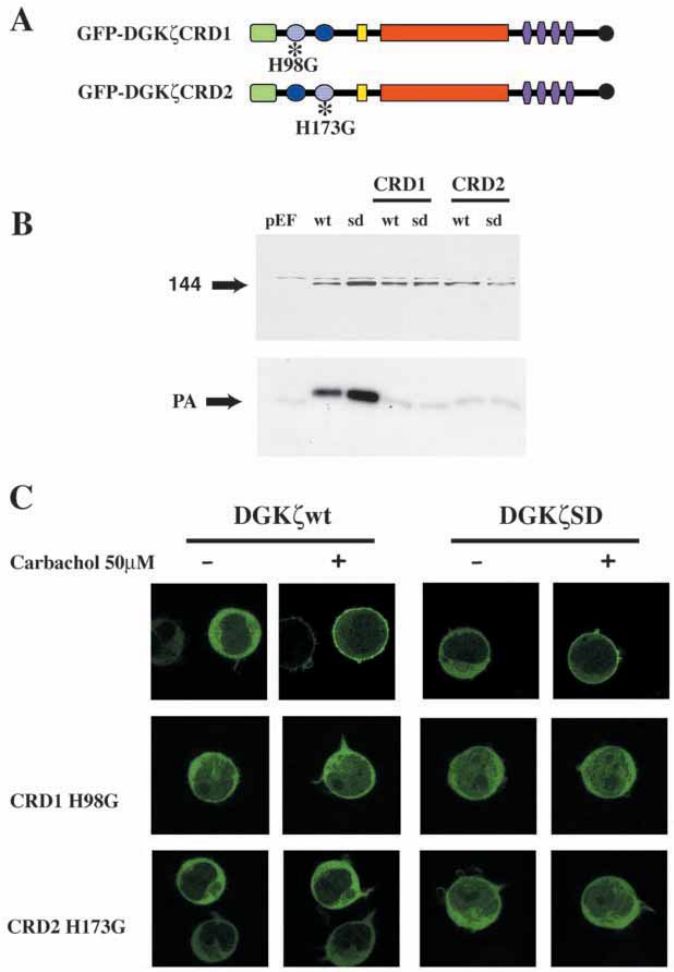


FIG. 4. **The CRDs in DGKζ are essential for enzyme activity and carbachol-induced translocation.** *A*, GFP-DGKζCRD1 and GFP-DGKζCRD2 constructs were generated by mutation of His-98 (CRD1) or His-173 (CRD2) to Gly in the wild type (*wt*) GFP-DGKζ or in the GFP-DGKζSD mutant. *B*, analysis of protein expression and enzyme activity. Expression of the constructs was analyzed by a Western blot of transfected COS-7 cells using an anti-GFP antibody (*top*). Kinase activity was assayed in cell lysates as described in the Fig. 1*B* legend (*bottom*). The figure represents a typical experiment showing the autoradiogram of the TLC plate corresponding to the area of PA standard migration. *C*, subcellular localization of the CRD mutants. J-HM1-2.2 cells were transfected with 20 μg of the different DNAs. After 24 h, cells were mounted on poly-L-lysine-coated chambers and, where indicated, stimulated with 50 μM carbachol for 5 min prior to image capture.

brane. Phosphorylation of the MARCKS domain is not the only necessary signal, however, as the EGFP-DGKζ (Ser → Asp) mutant requires receptor stimulation for membrane translocation.

Intact CRD1 and CRD2 Are Required for Enzymatic Activity and Carbachol-induced Translocation of DGKζ—All DGKs have at least two CRDs of unknown function. Studies (31) of other DGK isoforms suggested that mutants lacking both CRDs are still active and have enzymatic properties similar to those of the intact enzyme. To study the role of DGKζ CRDs, a GFP-fused mutant was generated in which the entire N-terminal domain containing the two CRDs was deleted (DGKζMCA; Fig. 3*A*). This mutant showed unique localization when expressed in J-HM1-2.2 cells; unlike intact DGKζ, intense fluorescence was observed mainly at the nucleus with faint cytosolic fluorescence (Fig. 3*B*). When examined, carbachol stimulation of the cells produced no changes in the localization of the truncated enzyme (not shown). To better study the role of the CRDs, we next generated two point mutants in which the first His of each CRD, which is involved in zinc coordination, was replaced with Gly (CRD1 H98G and CRD2 H173G) (Fig. 4*A*). These mutations were introduced in both the wild type protein and the MARCKS domain Ser → Asp mutant. All mutant proteins were the same size as the wild type and were inactive in an *in vitro* assay (Fig. 4*B*). When examined, the four mutants showed cytosolic localization (Fig. 4*C*) similar to that found for the wild type protein. None of the mutants translocated to the plasma membrane in response to carbachol addition, however, and they remained cytosolic for the period of the stimulation procedure (Fig. 4*C*). This indicates that both CRDs in DGKζ are essential for PA production and membrane translocation.

The Ankyrin Repeats and PDZ-binding Motif Are Not Essential for Enzyme Activity and Membrane Translocation—Mammalian type IV DGKs are most closely related to the *Drosophila* DGK2, which is derived from the *rdgA* gene. DGK2 mutants bearing a truncation of the C-terminal ankyrin repeat show retinal degeneration, suggesting that this domain is essential for enzyme function in the retina (21). Using double hybrid technology, DGKζ was found to interact with the leptin receptor through the C-terminal domain containing the ankyrin repeats (26). This C-terminal portion of the enzyme also contains a PDZ-binding motif that interacts with syntrophins (27). Given the apparent relevance of these domains on functions attributed to type IV DGKs, two new EGFP-DGKζ truncation mutants were generated and used to investigate enzyme translocation following receptor stimulation. In one, the four amino acids of the PDZ-binding domain were eliminated. Another

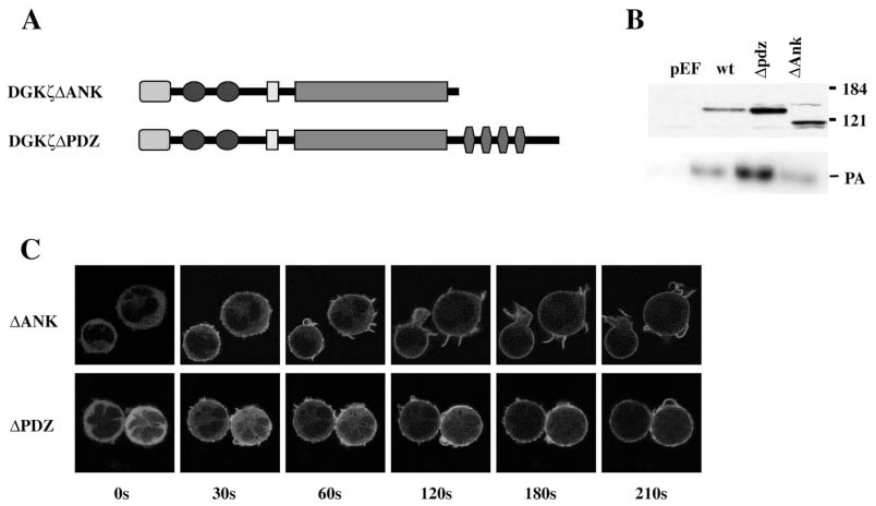


Fig. 5. **The DGKζ ankyrin repeats and PDZ binding sequence are not required for enzyme activity or carbachol-induced translocation.** *A*, GFP-DGKζΔANK and GFP-DGKζΔPDZ constructs were generated by C-terminal truncations that eliminated either the four ankyrin repeats and the PDZ-binding motif or only the PDZ-binding motif. *B*, protein expression and enzyme activity of GFP-DGKζΔANK and GFP-DGKζΔPDZ chimeras. COS-7 cells were transiently transfected with empty vector, GFP-DGKζ, GFP-DGKζΔPDZ, or GFP-DGKζΔANK mutants. Protein expression was determined by an immunoblot of cell lysates using an anti-GFP antibody. The molecular mass of marker proteins is indicated on the *right*. Kinase activity of the constructs was determined as described in the Fig. 1*B* legend. *C*, time-lapse confocal imaging of the subcellular localization of GFP-DGKζΔANK and GFP-DGKζΔPDZ following carbachol stimulation. Cells were transiently transfected with the indicated constructs; 24 h later they were plated on poly-L-lysine-coated chambers and mounted on a 37 °C plate, and the subcellular localization of the protein was determined after stimulation with 50 μM carbachol. Δ*ANK*, ankyrin domains deletion; *wt*, wild type.

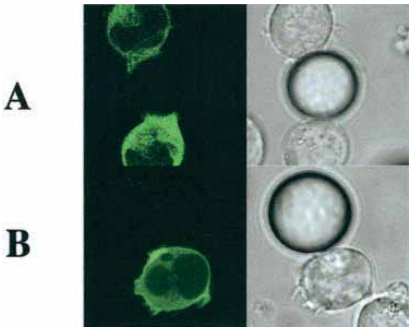


Fig. 6. **CD3/CD28-induced DGKζ redistribution to the T-cell synapse requires deletion of the C-terminal domain.** J-HM1-2.2 cells were transiently transfected with GFP-DGKζwt (*A*) or GFP-DGKζΔANK (*B*). After 24 h, cells were plated on coverslips and mixed with CD3/CD28-coated microspheres as described under "Experimental Procedures." The chambers were mounted on a 37 °C plate on the confocal microscope for image capture (*left*). The bright field image of the same cells is shown at *right*.

mutant was constructed by deleting the entire C-terminal region of the protein, which contains both the ankyrin repeats and the PDZ-binding motif (Fig. 5*A*). When analyzed, both proteins were of the appropriate size, and each phosphorylated DAG in an *in vitro* assay, indicating that these domains are not required for enzyme activity (Fig. 5*B*). Our study of protein dynamics showed that neither the deletion of the entire C-terminal domain or of the PDZ-binding motif alone had any effect on protein translocation in response to carbachol (Fig. 5*C*).

The DGKζ C Terminus Contains a Negative Regulatory Domain—We next examined whether, in addition to carbachol, a more physiological stimulus could also induce DGKζ translocation to the plasma membrane. For this, we examined GFP-DGKζ redistribution after stimulation with anti-CD3/anti-CD28 antibody-coated microspheres. GFP-PKCθ was used as a positive control of relocalization to the contact area (32). Whereas PKCθ translocated consistently to the plasma membrane region at which contact with the antibody-coated beads takes place (not shown), wild type GFP-DGKζ did not translocate to the membrane under the same conditions (Fig. 6*A*). The GFP-DGKζ Ser → Asp MARCKS mutant (not shown) also failed to relocate in response to CD3-CD28 stimulation. When the C-terminal deletion mutant GFP-DGKζΔANK was tested, however, we observed rapid translocation to the membrane, which was restricted to the area of contact with the stimulating beads (Fig. 6*B*). Similar results were obtained when anti-CD3-coated beads were used. This shows that, in DGKζ, the C-terminal region of the protein has a restrictive regulatory role that cannot be circumvented by the signals initiated after TCR triggering.

Expression of the DGKζ C Terminus Prevents Translocation of the Wild Type Protein—The DGKζ C-terminal deletion mutant, lacking the PDZ-binding motif and the four ankyrin repeats, relocalizes to the TCR synapse following stimulation. This indicates the presence of some type of regulatory restriction imposed by the DGKζ C-terminal domain. The presence of ankyrin domains and a PDZ-binding sequence suggests the possibility of a protein-protein interaction through this domain. We next studied the effect of DGKζ CT expression in DGKζ translocation kinetics after carbachol stimulation. As demonstrated, carbachol addition induced rapid translocation of DGKζ, which was found at the membrane as soon as 60 s after receptor stimulation (Fig. 7*B*, *top*). When DGKζ was co-expressed with the plasmid encoding the CT domain, however, translocation of the enzyme was fully prevented, and cytosolic localization was still found for the protein 2 min after stimulation (Fig. 7*B*, *bottom*). These results further point to a role for the DGKζ CT domain in the regulation of protein translocation.

DISCUSSION

DGKζ mRNA is abundantly expressed in lymphoid tissues, although direct regulation of this enzyme following receptor

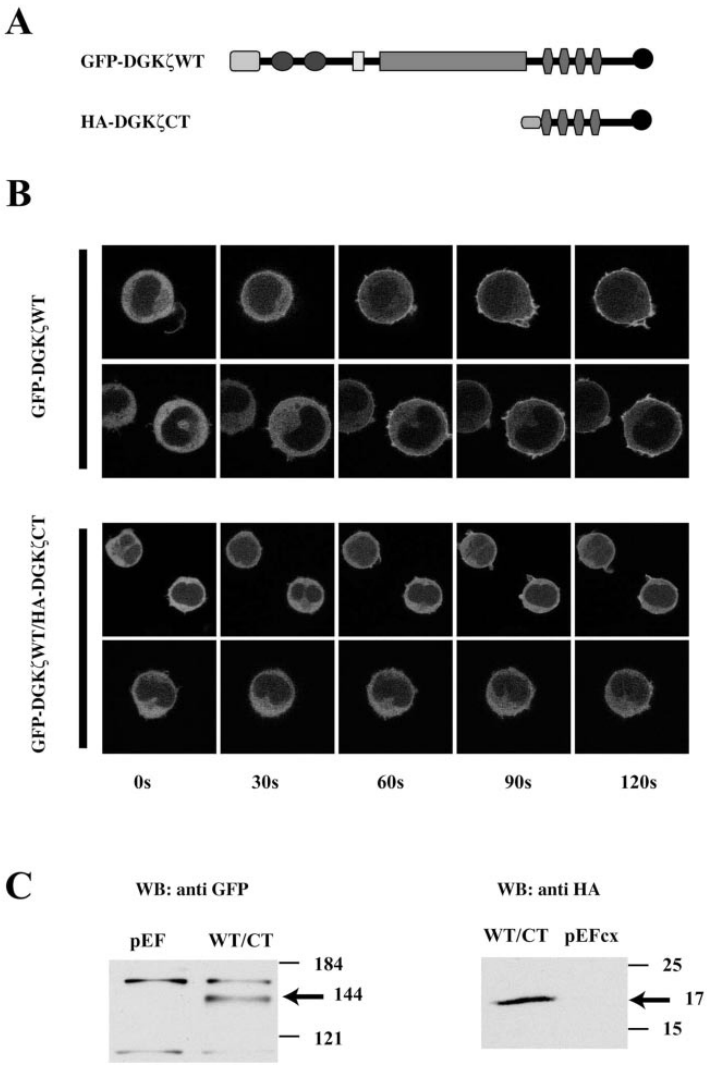


FIG. 7. **DGKζ C-terminal domain expression prevents carbachol-induced translocation of the wild type enzyme.** *A*, the HA-DGKζCT construct encoded the C-terminal domain of DGKζ containing the ankyrin repeats and the PDZ-binding sequence fused to a hemagglutinin (HA) epitope. *B*, time-lapse confocal imaging of the subcellular localization of GFP-DGKζwt alone (*top*) or cotransfected with HA-DGKζCT (*bottom*). J-HM1-2.2 cells were transiently transfected with the indicated constructs; 24 h later they were plated on poly-L-lysine-coated chambers and mounted on a 37 °C plate, and the subcellular localization of GFP-DGKζwt was determined after carbachol stimulation. *C*, lysates of J-HM1-2.2 cells were analyzed for GFP-DGKζwt or HA-DGKζCT expression using anti-GFP (*left*) or anti-HA (*right*) antibodies. *WT*, wild type.

stimulation has not been examined previously in T-lymphocytes. Here, we used a Jurkat T-cell line stably transfected with a muscarinic type I receptor; this allows examination of DAG-regulated signals generated by the addition of a soluble ligand. Using this model, we show that DGKζ is located in the cytosol of living T-cells and that it translocates very rapidly to the plasma membrane in response to receptor stimulation. Other DGK isoforms have been shown previously to translocate to the membrane in response to agonists, and the extent and duration of this translocation was dependent both on the isoform examined and the agonist used. With this cell line, we demonstrated previously (33) rapid, transient translocation of DGKα following triggering of both muscarinic receptors and TCR. In COS-7 cells, this isoform translocates irreversibly to the plasma membrane in response to arachidonate and transiently when cells are ATP-treated (34). DGKγ relocates at the plasma membrane in a sustained manner in response to TPA and transiently in response to arachidonic acid and ATP (34). Translocation to the membrane, where these enzymes gain access to their substrate, thus appears to be a general mechanism of DGK regulation as it is for other lipid-modulating enzymes. As we showed previously for the α-isoform (33), kinase activity is not necessary for DGKζ translocation to the plasma membrane. Enzymatic activity of DGKα, although not required for translocation, regulates enzyme stabilization at the membrane (33). Translocation of the wild type α-isozyme is a very rapid and transient event, whereas a catalytically inactive mutant remains at the membrane for a longer period of time. This suggests the existence of feedback regulation based on PA generation; we showed that the EF-hand motif, characteristic of type I enzymes, is responsible for this control (33). Subtype IV DGKs are apparently not subject to this type of regulation as might be predicted because of the lack of EF-hand domains. The possibility of PA-driven feedback regulation for DGKζ nonetheless cannot be ruled out, because we observe that some agonists that cause transient, partial translocation of the wild type enzyme induce a more sustained, almost complete translocation of the catalytically inactive mutant.[2]

[2] T. Santos, S. Carrasco, D. R. Jones, I. Mérida, and A. Eguinoa, unpublished results.

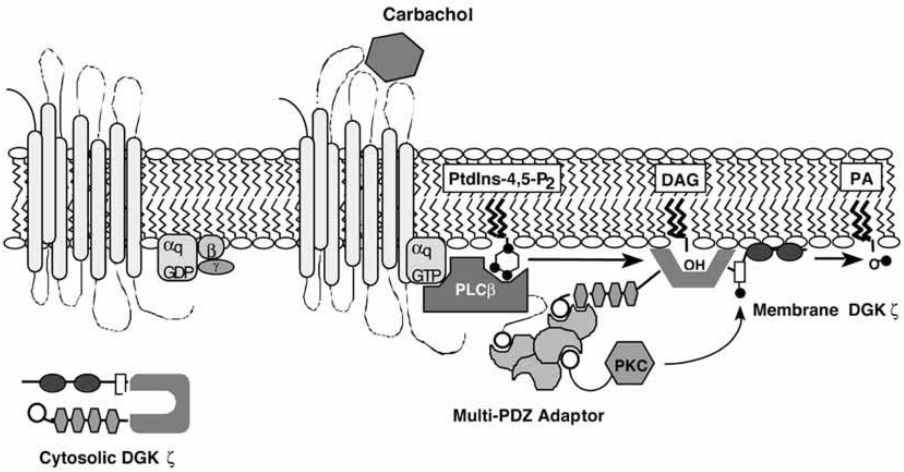


FIG. 8. **A model for DGKζ activation by the muscarinic type-1 receptor.** In the absence of ligand, DGKζ is found in the cytosol. Following receptor stimulation, DGKζ binds to a scaffolding protein through the C-terminal domain; this in turn favors phosphorylation of the MARCKS domain and subsequent membrane localization of the protein through the DGKζ membrane-binding domains. *PtdIns-4,5-P_2*, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate.

TABLE I
A summary of the effects of DGKζ domain mutations on receptor-induced translocation and enzyme activity

	Translocation	Activity
DGKζ-wt	+	+
DGKζ -Kd	+	-
DGKζ-SA	-	+
DGKζ-SD	+	+
DGKζΔAnk	+	+
DGKζΔPDZ	+	+
DGKζ-MCA	-	-
DGKζ-CRD1	-	-
DGKζ-CRD2	-	-

DGKζ localizes both in the cytosol and the cell nuclei in transfected COS-7 cells, and translocation between these two fractions is proposed to be regulated by PKC-dependent phosphorylation of the MARCKS domain (23–25). We did not observe nuclear localization in the J-HM1-2.2 cell subline or in the parental Jurkat T-cells at any stage of the cell cycle. Only deletion of the CRD induced the expression of a truncated mutant with nuclear localization, probably due to greater exposure of the nuclear localization sequence in the MARCKS domain (25). DGKζ thus appears to be a cytosolic enzyme in lymphoid cells, and nuclear localization may be associated with some specific function in the nucleus of certain tissues. A role for DGKζ at the plasma membrane is reinforced by the fact that DGKζ has been found to be associated with transmembrane proteins such as the leptin receptor, with cytosolic proteins that translocate to the plasma membrane such as RasGRP, or with plasma membrane components such as syntrophins (26–28).

DGKζ contains several regulatory domains, and here we analyzed the structural requirements for lipid kinase activity of the enzyme. The results indicate that the domains located at the C-terminal end of the protein are not involved in DAG phosphorylation (Table I). Ankyrin repeats and PDZ-binding sequences are well known protein-protein interaction motifs (35, 36); hence, it is not surprising that their role is unrelated

to the enzymatic activity of DGKζ. PKC-dependent phosphorylation of MARCKS is also involved in the regulation of protein interaction with lipid membranes and/or cytoskeleton components (37, 38). Accordingly, phosphorylation of this motif does not appear to be involved in PA production by DGKζ, as mutation of the critical residues in the MARCKS-like domain produces a fully catalytically active enzyme. The only DGKζ requirements for DAG phosphorylation appear to be an intact CRD and the catalytic domain. The CRDs of most DGKs, including the ζ isoform, lack the critical residues required for interaction with phorbol esters (39); direct interaction of these conserved domains with DAG thus seems unlikely. The fact that CRD mutations produce an inactive enzyme may reflect a structural change in this domain that prevents correct interaction of the protein with the membranes, although not necessarily with the substrate. Intact CRDs would thus be essential for DGKζ interaction with biological membranes and, in the *in vitro* assays, with substrate-containing micelles.

This is the first report of DGKζ translocation in response to receptor triggering in living cells. Our results suggest that distinct sequential events are necessary for DGKζ to relocate from the cytosol to the plasma membrane. The generation of mutants at the MARCKS domain indicates that phosphorylation of the Ser residues in the basic cluster domain with homology to MARCKS is essential for translocation (Table I). This domain has been found in proteins that shuttle between the cytosol and the plasma membrane where PKC-dependent phosphorylation promotes cytosolic localization by introducing charges into the basic cluster and releasing cytoskeletal constraints (37, 38). For DGKζ, phosphorylation of the MARCKS domain has the opposite effect, because it is required for membrane association. The MARCKS domain is also found in proteins that interact with the actin cytoskeleton, and phosphorylation was shown to release cytoskeletal constraints (38). We do not know the exact consequence of modulating the charges in the DGKζ MARCKS domain, but we hypothesize that this phosphorylation allows correct protein interaction with the plasma membrane either by releasing some cytoskeletal restriction or inducing a conformational change.

A mutant in which MARCKS domain Ser residues are replaced by amino acids that mimic phosphorylation remains cytosolic and requires receptor stimulation for translocation. This demonstrates that, albeit necessary, the phosphorylation of Ser residues in the DGKζ MARCKS domain it is not sufficient to induce membrane localization of the enzyme. Furthermore, the stimulation of T-cells via the endogenous TCR does not promote membrane localization of DGKζ. This may indicate that DGKζ is an enzyme regulated exclusively in response to G protein-coupled receptors and not after the triggering of tyrosine kinase-coupled receptors. The DGKζ C-terminal deletion mutant, which lacks the PDZ-binding motif and the four ankyrin repeats, is nonetheless able to relocalize to the TCR synapse following stimulation. In addition, the expression of the C-terminal domain of DGKζ prevents translocation of the wild type protein in response to carbachol. This led us to favor a hypothesis in which membrane localization of DGKζ would be regulated by the interaction of these domains with a yet to be characterized protein. In this context, the activation of the type I muscarinic receptor promotes the interaction of PLCβ isoforms with multi-PDZ-containing adaptors that induce the scaffolding and membrane localization of other signaling molecules such as NHERF, SHANK, or E3KARP (40). We thus propose a model (Fig. 8) in which cytosolic DGKζ in unstimulated cells would exhibit a folded conformation with the C-terminal end, preventing protein interaction with the membrane. Receptor stimulation would promote DGKζ interaction with a hypothetical scaffolding protein, which would allow PKC-driven phosphorylation of the MARCKS domain and, finally, enzyme accessibility to the membrane. The C-terminal domain of DGKζ is thus not strictly necessary for plasma membrane translocation but is in turn essential for receptor selectivity. Deletion of the C-terminal region would eliminate this receptor-dependent restriction. Accordingly, only the truncated enzyme in which the C-terminal domain is deleted translocates in response to TCR-dependent signals.

The targeting of signaling molecules to specific cellular components is determined not only by signals generated by receptor occupancy, but also by features intrinsic to the proteins. These mechanisms allow a very specific interaction between enzymes and substrates and finally determine the onset of different cellular responses. The detailed analysis presented here of the roles of the DGKζ domains in enzyme activity and membrane translocation in living cells demonstrate that this enzyme is subject to tight regulation following receptor triggering. As we show, whereas membrane localization of DGKζ requires intact CRD and is highly dependent on DAG-regulated signals, the C-terminal domain introduces a means for selectivity of DGKζ activation among receptors.

Acknowledgments—We express our thanks to all members of the Mérida lab for critical comments and suggestions. We thank Drs. S. Mañes and M. Campanero for critical reading of the manuscript and C. Mark for excellent editorial assistance. The cDNA from DGKIV was a kind gift of Prof. K. Goto. The J-HM1-2.2 cells were obtained from Dr. A. Weiss.

REFERENCES

1. Payrastre, B., Missy, K., Giuriato, S., Bodin, S., Plantavid, M., and Gratacap, M. (2001) *Cell. Signal.* **13,** 377–387
2. Ron, D., and Kazanietz, M. (1999) *FASEB J.* **13,** 1658–1676
3. Nurrish, S., Segalat, L., and Kaplan, J. (1999) *Neuron* **24,** 231–242
4. Ebinu, J. O., Stang, S. L., Teixeira, C., Bottorff, D. A., Hooton, J., Blumberg, P. M., Barry, M., Bleakley, R. C., Ostergaard, H. L., and Stone, J. C. (2000) *Blood* **95,** 3199–3203
5. Caloca, M. J., Garcia-Bermejo, M. L., Blumberg, P. M., Lewin, N. E., Kemmer, E., Mischak, H., Wang, S., Nacro, K., Bienfait, B., Marquez, V. E., and Kazanietz, M. G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96,** 11854–11859
6. Topham, M. K., and Prescott, S. M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 11447–11450
7. Burger, K., Demel, R., Schmid, S., and de Kruijff, B. (2000) *Biochemistry* **39,** 12485–12493
8. Chalfant, C., Kishikawa, K., Mumby, M., Kamibayashi, C., Bielawska, A., and Hannun, Y. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 20313–20317
9. Dalton, K., East, J., Mall, S., Oliver, S., Starling, A., and Lee, A. (1998) *Biochem. J.* **329,** 637–646
10. Frank, C., Keilhack, H., Opitz, F., Zschornig, O., and Bohmer, F. (1999) *Biochemistry* **38,** 11993–12002
11. Garcia-Garcia, J., Corbalan-Garcia, S., and Gomez-Fernandez, J. (1999) *Biochemistry* **38,** 9667–9675
12. Grange, M., Sette, C., Cuomo, M., Conti, M., Lagarde, M., Prigent, A., and Nemoz, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 33379–33387
13. Jenkins, G., Fisette, P., and Anderson, R. (1994) *J. Biol. Chem.* **269,** 11547–11554
14. Limatola, C., Schaap, D., Moolenaar, W., and van Blitterswijk, W. (1994) *Biochem. J.* **304,** 1001–1008
15. Litosch, I. (2000) *Biochemistry* **39,** 7736–7743
16. Manifava, M., Thuring, J., Lim, Z., Packman, L., Holmes, A., and Ktistakis, N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276,** 8987–8994
17. Pawelczyk, T., and Matecki, A. (1999) *Eur. J. Biochem.* **262,** 291–298
18. Rizzo, M., Shome, K., Watkins, S., and Romero, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 23911–23918
19. Katagiri, T., Mizoguchi, T., and Shinozaki, K. (1996) *Plant Mol. Biol.* **30,** 647–653
20. Miller, K., Emerson, M., and Rand, J. (1999) *Neuron* **24,** 323–333
21. Masai, I., Okazaki, A., Hosoya, T., and Hotta, Y. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90,** 11157–11161
22. van Blitterswijk, W. J., and Houssa, B. (2000) *Cell. Signal.* **12,** 595–605
23. Bunting, M., Tang, W., Zimmerman, G., McIntyre, T., and Prescott, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271,** 10230–10236
24. Goto, K., and Kondo, H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93,** 11196–11201
25. Topham, M. K., Bunting, M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Blackshear, P. J., and Prescott, S. M. (1998) *Nature* **394,** 697–700
26. Liu, Z., Chang, G., and Leibowitz, S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276,** 5900–5907
27. Hogan, A., Shepherd, L., Chabot, J., Quenneville, S., Prescott, S. M., Topham, M., and Gee, S. H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276,** 26526–26533
28. Topham, M. K., and Prescott, S. M. (2001) *J. Cell Biol.* **152,** 1135–1143
29. Desai, D., Newton, M., Kadlece, T., and Weiss, A. (1990) *Nature* **348,** 66–69
30. Izquierdo, M., Ruiz-Ruiz, M., and Lopez-Rivas, A. (1996) *J. Immunol.* **157,** 21–28

31. Sakane, F., Kai, M., Wada, I., Imai, S., and Kanoh, H. (1996) *Biochem. J.* **318,** 583–590
32. Monks, C., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A., and Kupfer, A. (1997) *Nature* **385,** 83–86
33. Sanjuan, M. A., Jones, D. R., Izquierdo, M., and Merida, I. (2001) *J. Cell Biol.* **153,** 207–220
34. Schirai, Y., Segawa, S., Kuriyama, M., Goto, K., Sakai, N., and Saito, N. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 24760–24766
35. Andrade, M., Perez-Iratxeta, C., and Ponting, C. (2001) *J. Struct. Biol.* **134,** 117–131
36. Sheng, M., and Sala, C. (2001) *Annu. Rev. Neurosci.* **24,** 1–29
37. Arbuzova, A., Murray, D., and McLaughlin, S. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1376,** 369–379
38. Matsuoka, Y., Li, X., and Bennett, V. (1998) *J. Cell Biol.* **142,** 485–497
39. Zhang, G., Kazanietz, M., Blumberg, P., and Hurley, J. (1995) *Cell* **81,** 917–924
40. Suh, P. G., Hwang, J. I., Ho Ryu, S., Donowitz, M., and Ho Kim, J. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288,** 1–7

Biochem. J. (2002) **368**, 809–815 (Printed in Great Britain)

Dictyostelium discoideum has a single diacylglycerol kinase gene with similarity to mammalian θ isoforms

Marc A. DE LA ROCHE*, Janet L. SMITH†, Maribel RICO‡, Silvia CARRASCO§, Isabel MERIDA§, Lucila LICATE‡, Graham P. CÔTÉ* and Thomas T. EGELHOFF‡[1]

*Department of Biochemistry, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6, †Boston Biomedical Research Institute, 64 Grove Street, Watertown, MA 02472-2829, U.S.A., ‡Department of Physiology and Biophysics, Case Western Reserve School of Medicine, Cleveland, OH 44016-4970, U.S.A., and §Department of Immunology and Oncology, National Center for Biotechnology, Campus de Cantoblanco, Madrid 28049, Spain

Diacylglycerol kinases (DGKs) phosphorylate the neutral lipid diacylglycerol (DG) to produce phosphatidic acid (PA). In mammalian systems DGKs are a complex family of at least nine isoforms that are thought to participate in down-regulation of DG-based signalling pathways and perhaps activation of PA-stimulated signalling events. We report here that the simple protozoan amoeba *Dictyostelium discoideum* appears to contain a single gene encoding a DGK enzyme. This gene, *dgkA*, encodes a deduced protein that contains three C1-type cysteine-rich repeats, a DGK catalytic domain most closely related to the θ subtype of mammalian DGKs and a C-terminal segment containing a proline/glutamine-rich region and a large asparagine-repeat region. This gene corresponds to a previously reported myosin II heavy chain kinase designated myosin heavy chain-protein kinase C (MHC-PKC), but our analysis clearly demonstrates that this protein does not, as suggested by earlier data, contain a protein kinase catalytic domain. A FLAG-tagged version of DgkA expressed in *Dictyostelium* displayed robust DGK activity. Earlier studies indicating that disruption of this locus alters myosin II assembly levels in *Dictyostelium* raise the intriguing possibility that DG and/or PA metabolism may play a role in controlling myosin II assembly in this system.

Key words: diacylglycerol kinase (DGK), myosin II, myosin II heavy chain kinase (MHCK), phosphatidic acid, protein kinase C (PKC).

INTRODUCTION

Eukaryotic diacylglycerol kinases (DGKs) are a widespread family of enzymes, with conserved representatives present in higher plants and throughout the Animal Kingdom. Based upon domain architecture, mammalian DGKs can be grouped into five classes, with some of these classes recognizable in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* as well. The different classes display an array of accessory/signalling domains outside of the conserved catalytic domain, including strongly conserved cysteine-rich repeats, Pleckstrin homology (PH) domains, EF-hand motifs, Ras-associating domains, proline-rich domains and ankyrin repeats [1–3].

Earlier studies in *Dictyostelium discoideum* suggested a link between DGK signalling and myosin II assembly control [4,5]. In this system myosin II assembly and localization to discrete subcellular structures is regulated via phosphorylation of three threonine residues in the tail region of the myosin II heavy chain (MHC) [6–8]. Two distinct types of myosin II heavy chain kinase (MHCK) have been reported to participate in this process. One group is comprised of the structurally related kinases MHCK A [9,10], MHCK B [11] and MHCK C [12,13]. These enzymes all contain a novel protein kinase catalytic domain linked to a C-terminal WD-repeat domain, and represent founding members of a protein kinase family known as alpha kinases [14]. In addition, an MHCK with an apparent molecular mass of 84000 Da as determined by SDS/PAGE was purified from developmental-phase *Dictyostelium* cells [15]. Antibodies generated against this protein were used to screen a cDNA expression library, and the isolated cDNA clone was described as encoding a protein kinase C (PKC)-like protein [16]. This protein kinase was denoted myosin heavy chain-protein kinase C (MHC-PKC), reflecting its apparent PKC character and the fact that it was purified as an MHCK activity (GenBank accession nos, protein, A46136; nucleotide, M93393). In retrospective analysis of this cDNA, it was reported that the central domain of MHC-PKC was in fact a near-complete DGK-type catalytic domain [4].

We have performed further analysis of this locus, including rapid amplication of 3′ cDNA ends (3′-RACE), genomic and reverse transcriptase PCR (RT-PCR), evaluation of the near-complete *Dictyostelium* genome database and Northern blotting. This analysis reveals the presence of a single gene encoding a protein that contains very strong similarity to mammalian DGKs, and a clear absence of a recognizable protein kinase catalytic domain. Previous Southern blot analysis and the near-complete *Dictyostelium* genome project indicate that this is the only DGK present in this organism. We propose that this locus be designated *dgkA*.

EXPERIMENTAL

Sequence analysis and cloning

The nucleotide sequence of the *dgkA* gene was assembled from independent sequence passes using the SeqMan module of the DNAStar software package. Initially 32 sequences obtained

Abbreviations used: DG, 1,2-diacylglycerol; DGK, diacylglycerol kinase; MHC, myosin II heavy chain; MHCK, myosin II heavy chain kinase; MHC-PKC, myosin heavy chain-protein kinase C; PA, phosphatidic acid; PH, Pleckstrin homology; PI-3K, phosphoinositide 3-kinase; PKB, protein kinase B; PKC, protein kinase C; 3′-RACE, rapid amplication of 3′ cDNA ends; RT-PCR, reverse transcriptase PCR.

[1] To whom correspondence should be addressed (e-mail tte@po.cwru.edu).

The sequence of DgkA is available at the GenBank Nucleotide Sequence Database under accession no. AY152858.

from the *Dictyostelium* genome project (available at http://dictybase.org) were used to generate a contig that still contained ambiguities and several segments with only one or two sequence passes. To resolve these ambiguities, PCR products were synthesized from *Dictyostelium* genomic DNA (prepared according to the miniprep method of Nellen et al. [17]) and sequenced. Additional clones were generated using RT-PCR and 3′-RACE (see below) so that a total of 23 additional sequence passes were pooled together with the genome project data. This resulted in a minimum coverage of four sequence passes in every portion of the gene, with up to 8–10 passes in some regions, such as the location of the stop codon and the highly repetitive poly-asparagine stretch at the C-terminus of the coding region.

Initial Clustal alignments were performed to identify the conserved core segments of the catalytic domains for the final alignment used for Figure 2 (see below). For DgkA, this segment corresponds to residues 334–576. The DNAStar MegAlign software package was used to perform Clustal W aligments and to produce the phylogenetic tree. Genbank accession numbers for the human DGKs are: θ, NP_001338; ϵ, NP_003638; ζ, NP_003637; β, XP_003156; γ, XP_003156; α, NP_001336; δ, NP_003639.

A full-length copy of the *dgkA* gene was constructed from the products described above, including RT-PCR and 3′-RACE products, to generate a spliced cDNA copy of the gene. PCR was used to introduce a *Bam*HI site next to codon 2 of the *dgkA* coding region, allowing the gene to be subcloned into the vector pTX-FLAG [25] with the N-terminal FLAG epitope coding region positioned immediately upstream of codon 2 of *dgkA*. All segments subject to PCR were sequenced subsequently to confirm the absence of any PCR-generated sequence errors.

Immunoprecipitation and DGK activity assays

Immunoprecipitations were performed as follows. Cells (5×10^7) were collected from Petri dish cultures in HL5 medium, washed with 50 mM Tes, pH 7, then suspended in buffer containing 50 mM Tes, pH 7, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol and a protease inhibitor cocktail mix [18]. Cells were lysed by the addition of Triton X-100 (1 % final concentration) in a volume of 400 μl. Lysate was centrifuged briefly to remove particulate material, and a 10 μl packed volume of anti-FLAG IgG-conjugated beads (antibody M2; Sigma) was added to the cleared supernatant. Samples were incubated at 4 °C with agitation for 60 min. Beads were collected by centrifugation, washed twice with 50 mM Tes, pH 7, 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol and 1 mM EDTA. Beads were then resuspended in 20 μl of buffer containing FLAG peptide to elute bound protein (10 mM Tes, pH 7, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol and 200 μg/ml FLAG peptide; Sigma). Eluted material was stored at −80 °C until used for DGK activity assays.

DGK activity was assayed as described previously [19]. Briefly, diacylglycerol C8 (1,2 dioctanoyl glycerol; Sigma) was used as the lipid substrate in a 50 μl reaction volume containing 4 mM sonicated 1,2-diacylglycerol (DG), 20 mM ([γ-^{32}P]ATP, 10 μCi), 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris, pH 7.4, and 5 μl of immunopurified FLAG-DgkA as a source of the enzyme. The phosphorylation assay was carried out for 10 min at room temperature. At the end of the assay lipids were extracted by the subsequent addition of 200 μl of chloroform/methanol (2:1, v/v), 50 μl of chloroform and 50 μl of 0.1 M HCl. Organic layers were recovered, dried under a stream of nitrogen, taken up in 20 μl of chloroform/methanol (2:1) and applied to Whatman LK6D silica gel 60 A plates along with dioctanoyl phosphatidic acid (PA) as a standard. Plates were developed with a solvent system of chloroform/methanol/4 M NH_4OH (9:7:2, by vol.). Dried plates were subjected to autoradiography and the band corresponding to [^{32}P]PA was identified by co-migration with non-radioactive standard visualized by iodine staining.

RNA methods

Total RNA was extracted from vegetatively growing cells and at 4 h intervals during development using Trizol (Life Technologies) as described in [20]. For RT-PCR, cDNA synthesis was performed using 10 μg of total Ax3 RNA in a reaction mixture containing 5 μg of oligo dT_{18}, 40 units of RNasin, dNTPs and 200 units of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Promega) for 1 h at 37 °C. PCR reactions were performed using either *Taq* DNA polymerase (Life Technologies) or Expand high-fidelity polymerase (Roche Diagnostics). Products were gel-purified using the Qiaquick gel extraction kit (Qiagen), cloned into pCR 2.1 TA (Invitrogen) and sequenced.

The 3′-RACE was performed using a 3′-RACE kit (Life Technologies) according the manufacturer's protocol. The initial reverse transcriptase reaction was performed with 4.1 μg of total Ax2 RNA prepared 12 h after initiation of development. Amplification was performed in two independent reactions with oligo(dT) as the downstream primer and the *dgkA*-specific primers DAGK1604 (5′-CGATAAACCCGAAGATCGTAGAGTCATCG-3′) or DAGK1837 (5′-AGAGTCGATAGATCCATTGAGGGTATTATC-3′) as upstream primers in each amplification. Both of these primers bind within the conserved catalytic domain segment of *dgkA*. These PCR reactions yielded products that were approx. 1.3 and 1.1 kb. Products were cloned into the vector pCR4-TOPO (Invitrogen) and subjected to DNA sequencing.

Northern blotting was performed as described in [20] using RNA isolated from Ax2 cells. As a probe, a 1.3 kb cloned DNA fragment corresponding to the DGK catalytic domain (residues 1115–2358 of *dgkA*, produced as a PCR product) was labelled with [α-^{32}P]dCTP using a Rediprime II kit (Amersham Biosciences). The final wash stringency was $0.2 \times$ SSC/0.1 % SDS (where $1 \times$ SSC is 0.15 M NaCl/0.015 M sodium citrate) at 42 °C.

RESULTS

Characterization of the *dgkA* gene

The earlier report that the MHC-PKC gene sequence contained a near-complete DGK catalytic domain [4], and the very weak similarity of the reported MHC-PKC catalytic domain to established PKC catalytic domains [16], prompted us to perform further evaluation of this locus as represented in the near-complete *Dictyostelium* genome project database. We used available genome project raw sequence runs and additional sequences generated in-house from genomic PCR products to determine the sequence of the *dgkA* gene. The genomic locus appeared to encode a single open reading frame interrupted by a single intron. RT-PCR analysis confirmed that the predicted intron was in fact spliced out in mRNA. The 3′ end of the gene was mapped by 3′-RACE, using two different primers that bind within the DGK catalytic domain. The start ATG codon was deduced based upon the presence of an in-phase stop codon further upstream, and upon the presence of an extended AT-rich region further upstream with no recognizable splice junction motifs and no apparent coding segments. The resulting spliced sequence displays a single continuous open reading frame of 887

A

```
                                                                                   M  N  Q  L  N  I  S  H    8
   1 taaaaaaacttatttttataattatttattatttatttattattattactttttctatatggtaataaataaaaaATGAATCAATTAAATATATCGCAT
      N  W  K  I  K  S  F  T  S  I  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  18
 101 AATTGGAAAATAAAATCATTTACATCAATTgtaaatataaaagaaatttaaattaaatatttttatttttttaaaaaaactttctaacacactcaataaaa
      -  -  -  -  -  -  -  T  F  C  D  H  C  G  S  M  L  W  G  I  C  T  Q  G  F  Q  C  S  D  C  N  F  S  A  H   46
 201 ttcaaatataatttagACATTTTGTGATCACTGTGGTAGTATGTTATGGGGTATTTGCACACAAGGATTTCAATGCTCCGATTGCAACTTTAGCGCACA
       S  H  C  T  N  L  V  T  L  H  C  N  N  N  K  N  N  S  K  P  N  E  K  P  A  T  I  T  A  A  A  A  S   79
 301 TTCCCATTGTACAAATTTAGTCACATTACACTGTAATAATAATAAAAATAATAGTAAACCAAATGAAAAACCAGCAACAATAACAGCAGCAGCAGCATCA
      S  S  T  T  T  T  T  T  T  E  T  S  T  N  T  A  A  S  T  T  T  T  T  N  N  I  D  I  K  N  K  D  K  T  113
 401 TCATCAACTACAACTACAACCACTACAGAAACATCAACAAATACAGCAGCATCAACAACAACAACAACAAATAATATAGATATTAAAAATAAAGATAAAA
       P  T  T  S  P  F  S  S  P  I  L  S  S  Y  N  N  N  S  G  N  E  F  C  S  N  R  Q  H  K  F  H  K  T  146
 501 CACCAACAACATCACCATTTTCATCACCAATTTTATCATCATATAATAATAATAGTGGTAATGAATTTTGTAGTAATAGACAACATAAATTTCATAAAAC
       S  K  S  I  T  K  F  C  N  Y  C  R  E  T  T  F  T  I  S  G  E  P  V  M  C  S  E  C  R  Y  I  A  H  179
 601 ATCAAAATCAATTACAAAATTTTGTAATTATTGTAGGGAGACAACATTTACAATCTCTGGTGAACCAGTGATGTGTAGTGAATGTAGATATATTGCACAT
      G  H  C  Q  T  K  V  P  L  N  C  I  I  P  Y  S  S  P  I  N  T  I  N  D  G  G  N  V  R  H  H  W  V  E  213
 701 GGACATTGTCAAACAAAGGTACCATTAAATTGTATTATACCCTATTCATCACCAATCAATACGATCAATGATGGTGGTAATGTTAGACATCATTGGGTTG
       G  N  L  K  K  S  K  K  C  I  H  C  M  E  P  C  E  K  S  F  S  L  A  H  Y  K  C  L  W  C  H  K  Y  246
 801 AAGGTAATTTAAAAAAGAGTAAAAAGTGTATACATTGTATGGAACCATGTGAAAAATCATTCTCTTTAGCTCATTATAAATGTTTATGGTGTCATAAATA
       L  H  S  S  C  F  D  K  H  N  P  I  C  D  F  G  S  L  S  D  M  I  L  P  P  S  S  I  R  L  L  S  T  279
 901 TTTACATAGTTCATGTTTTGATAAACATAATCCAATTTGTGATTTTGGTTCATTATCTGATATGATTTTACCACCTTCTTCAATTAGATTATTATCAACA
      T  A  T  T  T  N  K  I  E  K  L  I  I  E  E  Q  Q  P  Q  L  S  S  S  P  S  S  P  R  L  N  I  N  N  N  313
1001 ACAGCAACTACTACAAATAAAATTGAAAAGTTAATAATTGAAGAACAACAACCACAATTATCATCATCACCATCTTCACCAAGATTAAATATTAATAATA
       N  N  N  N  E  I  I  E  W  E  L  I  E  N  S  N  M  P  E  K  V  L  F  V  F  V  N  S  K  S  G  G  Q  346
1101 ATAATAATAATAATGAAATTATTGAATGGGAATTAATTGAAAATTCAAATATGCCAGAAAAAGTTTTATTTGTATTTGTAAATTCAAAGAGTGGTGGTCA
      F  G  S  T  L  I  R  K  L  S  S  L  L  N  P  L  Q  I  I  D  L  I  K  C  G  G  P  D  S  T  L  Q  M  379
1201 ATTTGGTAGTACATTAATTAGAAAGTTATCATCATTATTGAATCCTTTACAAATTATAGATTTAATTAAATGTGGTGGACCAGATTCAACCTTACAAATG
      I  N  R  Y  L  A  K  H  P  E  Q  T  N  R  F  R  I  L  V  C  G  G  D  G  T  V  G  W  L  F  K  Q  M  T  413
1301 ATTAATAGATATTTAGCAAAACATCCAGAACAAACCAATAGATTTAGAATTTTAGTTTGTGGTGGTGATGGTACAGTTGGTTGGTTATTTAAACAAATGA
       K  H  L  V  P  S  T  I  P  I  G  I  I  P  L  G  T  G  N  D  L  A  R  S  L  G  W  G  I  G  Y  D  G  446
1401 CAAAACATTTGGTTCCATCAACTATACCCATTGGTATTATACCATTGGGTACTGGTAATGATTTGGCACGTTCGTTAGGTTGGGGTATTGGATATGATGG
      E  K  L  I  E  I  L  K  S  I  N  E  A  K  T  I  Q  M  D  T  W  S  I  E  M  W  D  D  D  K  P  E  D  479
1501 TGAAAAGCTAATTGAAATCTTAAAGAGTATAAATGAAGCTAAAACAATTCAAATGGATACTTGGAGTATTGAAATGTGGGATGACGATAAACCCGAAGAT
      R  R  V  I  E  M  N  N  Y  F  S  I  G  L  D  A  M  V  A  L  G  F  H  L  A  R  N  A  N  P  Q  L  F  T  513
1601 CGTAGAGTCATCGAAATGAATAACTACTTTAGCATTGGGTTGGATGCAATGGTGGCATTGGGTTTTCATTTAGCAAGGAATGCAAATCCTCAACTTTTCA
       G  R  T  V  N  K  L  W  Y  T  K  I  G  L  E  E  F  V  T  K  N  F  V  S  L  A  R  I  V  K  I  N  V  546
1701 CAGGTCGTACAGTTAATAAACTTTGGTATACAAAGATTGGTCTTGAGGAATTTGTTACAAAGAATTTCGTTAGTCTAGCTAGAATCGTTAAAATTAATGT
      G  T  R  E  I  R  V  D  R  S  I  E  G  I  I  I  L  N  L  G  S  Y  A  G  G  V  D  L  W  G  A  N  R  579
1801 GGGAACTCGGGAAATTAGAGTCGATAGATCCATTGAGGGTATTATCATCCTCAATTTAGGTAGTTATGCTGGTGGTGTGGACTTATGGGGTGCCAATAGA
      K  D  N  Q  T  H  S  D  G  T  G  N  Q  F  I  D  D  Q  T  L  E  I  V  G  V  T  S  L  P  H  L  G  S  C  613
1901 AAAGATAACCAAACTCATAGTGATGGCACTGGTAATCAGTTTATCGATGATCAAACTTTGGAGATTGTTGGTGTCACTAGTTTACCCCATTTAGGTAGTT
       L  S  S  I  S  S  P  I  K  M  G  Q  A  D  E  I  R  I  Q  V  S  M  P  S  I  I  L  K  D  K  S  N  E  646
2001 GTTTAAGTTCAATTAGTTCTCCAATTAAAATGGGTCAAGCTGATGAAATTCGTATTCAAGTATCAATGCCTTCAATCATTTTAAAGGATAAAAGTAATGA
      I  E  T  A  F  Q  V  D  G  E  P  E  P  I  E  V  R  N  C  T  F  K  I  S  F  F  K  K  V  S  M  L  S  679
2101 AATTGAAACTGCTTTTCAAGTCGATGGTGAACCTGAACCAATTGAAGTTAGAAATTGTACTTTTAAAATATCTTTCTTTAAAAAGGTTTCAATGTTATCA
      N  R  S  F  K  P  R  I  E  N  H  D  S  D  L  S  T  F  Q  I  S  Q  S  P  N  L  Y  S  P  P  S  F  K  N  713
2201 AATCGTTCTTTTAAACCTAGAATTGAAAATCATGATTCTGATTTATCAACTTTTCAAATATCTCAATCACCAAATCTTTATTCTCCACCTTCTTTTAAAA
       P  P  P  N  L  N  Q  Y  Q  Q  P  H  Q  P  P  Q  S  Q  P  Q  P  Q  P  Q  P  Q  Q  S  L  Q  S  P  Q  746
2301 ATCCACCACCAAATTTAAATCAATATCAACAACCACATCAACCACCTCAATCACAACCTCAACCTCAACCTCAACCTCAACAATCACTTCAATCACCCCA
      S  P  E  P  I  N  N  N  T  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N   779
2401 ATCACCAGAACCGATAAATAATAATACTAATAATAATAATAATAATAACAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAAT
      N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  S  N  N  N  N  N  N  I  S  N  D  L  T  N  N  S  813
2501 AATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAGTAATAATAATAATAATAATATTTCAAATGATCTCACGAATAATA
       E  V  N  P  E  K  S  T  N  N  E  K  T  N  E  N  N  N  N  N  N  N  N  I  N  T  P  F  E  P  I  S  L  846
2601 GTGAAGTTAATCCTGAGAAAAGTACTAATAATGAAAAAACTAATGAAAATAATAATAATAATAACAACAATATAAATACTCCTTTTGAACCAATTTCATT
       P  D  E  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  N  E  T  N  S  E  K  S  Y   879
2701 ACCAGATGAAAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAACGAAACAAATTCTGAGAAAAGTTAT
      T  N  N  C  D  E  V  D  *                                                                             887
2801 ACAAATAATTGTGACGAAGTTGACtgattctttaataaatttaaattatatatcataaattaaaaaaaaaaaaaaaaaaaatggaaaaaataaaaataa
2901 actcctaaccgatttttagacttttgtttaagcattcgcgaatctatttttttatttttaatatattttcattttattttcatttgggagtttcag
                                              *
```

B

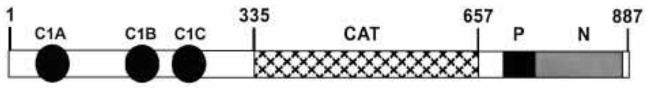


Figure 1 Gene structure and domain organization of *dgkA*

(**A**) Nucleotide and deduced amino acid sequence of *dgkA*. Lower-case nucleotide residues indicate non-coding sections, and upper-case represents sections deduced to correspond to protein-coding regions of the gene. Nucleotide residue numbers are indicated on the left and amino acid residue numbers on the right. Invariant amino acid residues of the cysteine repeat domain are highlighted black for repeat C1A (residues 8–57), grey for repeat C1B (residues 141–190) and black for repeat C1C (residues 209–259). Amino acid residues corresponding to the conserved DGK catalytic domain are underlined. The asterisk beneath residue 2937 indicates the last nucleotide present in the *dgkA* transcript before the poly(A)$^+$ tail, as identified from 3′-RACE product sequencing. (**B**) Schematic diagram of the domain organization of DgkA. The N-terminal segment of the protein contains three C1-type cysteine repeats (C1A, C1B and C1C). This segment is followed by a highly conserved DGK catalytic domain (CAT), a short proline-rich region (P) and large poly-asparagine stretch (N).

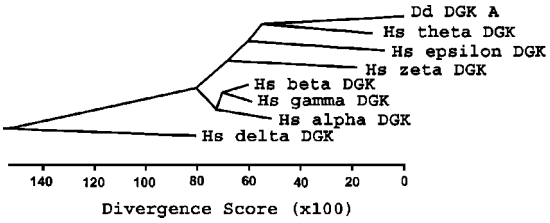


Figure 2 Phylogenetic analysis of the catalytic domains of DgkA and human DGKs

Sequences were aligned using the Clustal W algorithm in DNAStar 5.0. Very similar results were obtained with Clustal V. Sequence ends were trimmed to the core conserved catalytic domain for all sequences, which corresponds to residues 334–576 of DgkA. Dd, *D. discoideum*; Hs, *Homo sapiens*.

amino acids, encoding a polypeptide with a predicted molecular mass of 102.7 kDa and a pI of 7.34 (Figure 1A).

Domain organization of DgkA

The deduced protein sequence of DgkA contains cysteine-rich repeats at the N-terminus, a structural feature that is common to both PKCs and DGKs [21]. In both classes of enzyme these repeats display the strongly conserved H_2C_6 motif: His-Xaa_{12}-Cys-Xaa_2-Cys-$Xaa_{13/14}$-Cys-Xaa_2-Cys-Xaa_4-His-Xaa_2-Cys-Xaa_7-Cys.

This repeat motif is referred to as a C1-type repeat in accord with the original PKC nomenclature for the cysteine-rich repeat domain first identified in PKCs (reviewed in [21]). DgkA displays three complete C1 repeats (highlighted in black and grey in Figure 1A), followed by a conserved DGK catalytic domain (underlined in Figure 1A). C-terminal to the apparent DGK catalytic domain, DgkA contains a proline/glutamine-rich segment, followed by a large poly-asparagine segment.

In view of the unusually repetitive character of this downstream region, this segment of the gene was sequenced with a minimum of 8–10-fold redundancy, confirming the sequence as presented in Figure 1(A). In addition, 3′-RACE reactions revealed no splicing events anywhere in or downstream of the DGK catalytic domain. The genomic sequence and characterization of the mRNA thus confirm the domain organization indicated in Figure 1(B), with three C1-type repeats, a highly conserved DGK catalytic domain, a short proline-rich domain and a large poly-asparagine segment.

Domain analysis of DgkA

BLAST searches with the DGK-like catalytic domain segment of DgkA indicated strong conservation with known DGKs from a variety of organisms (e.g. 40% identity and 56% similarity reported by BLAST 2 sequences compared with human DGKθ). To evaluate this similarity further, we performed Clustal W alignments of the catalytic segment of DgkA, together with a set of DGK catalytic domains that included representatives of each of the five classes of human DGKs. In this analysis the DgkA catalytic domain consistently grouped most closely with the catalytic domain of the human DGKθ (Figure 2).

C1-type cysteine-rich repeats can be classified as ‘typical’ or ‘atypical’, based upon the presence in typical repeats of specific conserved residues such as proline at position 11 of the repeat and a glycine at position 23 that are thought to be critical for stabilizing the conformation of the DG-binding site (Figure 3; reviewed in [21]). Conventional PKCs display two C1 repeats in their N-terminal domain, and at least one of these always fits the consensus for the typical classification. This structural pattern is associated with the ability to bind DG and phorbol esters with high affinity (reviewed in [21]). Most DGKs also contain two C1-repeat motifs. However, with the exception of the C1A repeat of β and γ DGKs, DGK C1 repeats do not fit the typical profile. Evaluation of the three C1 repeats of DgkA revealed disagreements with the typical pattern in all three (Figure 3), indicating that these repeats fit the pattern normally present in mammalian DGKs rather than the pattern present in PKCs.

The presence of three C1 repeats in the DgkA protein is also noteworthy. To our knowledge the only other class of proteins known to contain three C1 repeats are the θ isoform subgroup of mammalian and nematode DGKs [1,2,22,23]. The conservation of the DgkA catalytic domain with mammalian DGKθ catalytic domains, and the conservation of the C1-repeat organization

```
Dd DGK
C1A   HNWKIKSFTSITFCDHCGSMLWGICT-QGFQCSDCNFSAHSHCTNLVTLHCNNNKNNSKPNEKPAT
C1B   HKFHKTSKSITKFCNYCRETTFTISG-EPVMCSECRYIAHGHCQTKVPLNCIIPYSSPINTINDGG
C1C   HHWVEGNLKKSKKCIHCMEPCEKSFSLAHYKCLWCHKYLHSSCFDKHNPICDFGSLSDMILPPSSI
typ   H h    h  P aC  C  hhhG h +QG  C  C h hH +C   h   C
ext   H  h  N     KC  C K       L    C WC    H  C       C hG h   hhPP

Human Theta DGK
C1A   HSFRKVTLTKPTFCHLCSDFIWG---LAGFLCDVCNFMSHEKCLKHVRIPCTSVAPSLVRVPVAHC
C1B   HCFGPRGLHKRKFCAVCRKVLE----APALHCEVCELHLHPDCVPFACSDCRQCHQDGHQDHDTHH
C1C   HHWREGNLPSGARCEVCRKTCGSSDVLAGVRCEWCGVQAHSLCSAALAPECGFGRLRSLVLPPACV
typ   H h    h  P aC  C  hhhG h +QG  C  C h hH +C   h   C
ext   H  h  N     KC  C K       L    C WC    H  C       C hG h   hhPP
```

Figure 3 C1 cysteine-rich repeats of DgkA compared with those of human DGKθ

Invariant residues of the H_2C_6 repeat are highlighted in light grey. Residues conforming to the ‘extended C1’ motif described previously [24] are highlighted in dark grey. In DgkA, as in the human DGKθ, only the C1 repeat closest to the catalytic domain (C1C in each case) displays the profile of the extended C1 motif. typ indicates the profile conserved in classic typical DG/phorbol ester-binding C1 domains such as present in PKCs. Bold residues on the Typ line represent residues that are characteristically invariant in typical PKC-type C1 domains. ext indicates the profile residues for the extended C1 motif. Bold residues on the Ext line represent residues that are characteristically invariant in DGK C1 domains that lie closest to the DGK catalytic domain. In each profile, upper-case letters refer to specific conserved amino acid residues, and lower-case symbols are: h, large hydrophobic (Trp, Tyr, Phe, Leu, Ile, Val, Met); a, aromatic; +, basic [21].

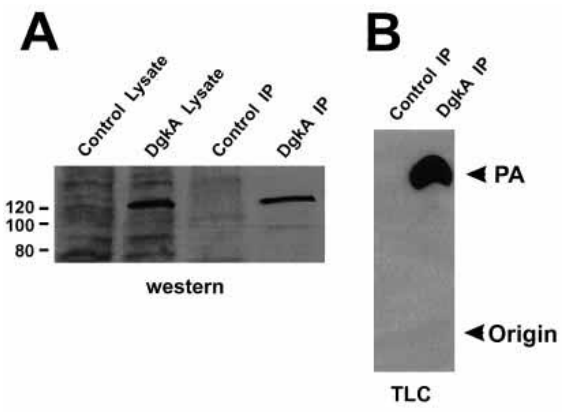


Figure 4 Expression and biochemical activity of FLAG-DgkA

(**A**) Control *Dictyostelium* cells and cells transfected with a FLAG-tagged version of *dgkA* were subjected to Western blot analysis using an anti-FLAG antibody. A 120 kDa band corresponding to FLAG-DgkA was apparent in crude cell lysates and in anti-FLAG immunoprecipitates from cells transfected with the FLAG-tagged *dgkA* gene. (**B**) Anti-FLAG immunoprecipitates from control cells and cells expressing FLAG-DgkA were assayed for DGK activity as described in the Experimental section. An autoradiogram shows that immunoprecipitates containing FLAG-DgkA phosphorylate DG to generate ^{32}P-labelled PA. PA indicates the position of migration of an unlabelled PA standard.

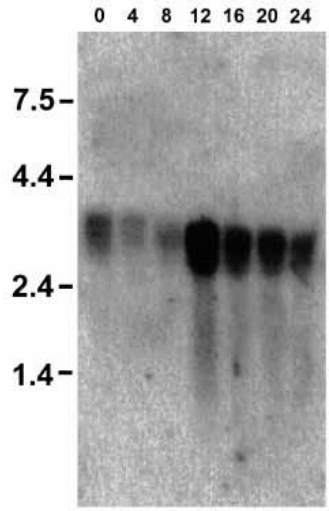


Figure 5 Northern blot indicating expression pattern of the *dgkA* gene

Ax2 cells were developed on buffered filter pads for the indicated number of hours prior to RNA isolation.

with θ isoforms may reflect conserved regulation or cellular roles between these enzymes as well. It should be noted that DgkA does display some differences from mammalian DGKθ isoforms. The mammalian isoforms contain a PH domain positioned between the C1 repeats and the catalytic domain, with the PH domain also reported to have Ras-interacting activity (reviewed in [2,3]). The relatively close placement of the DgkA C1C repeat to the catalytic domain appears to rule out the presence of a PH domain at this position, and we cannot detect any similarity to PH domains in other regions of the protein. Mammalian DGKθ also contains a proline-rich segment at the N-terminus. DgkA also displays a proline-rich segment, but it lies downstream of the catalytic domain rather than upstream. In common with the proline-rich segment of mammalian DGKθ, this downstream region contains examples of the motif PXXP, typical for proteins that can bind Src homology 3 domains.

Another diagnostic feature of DGK C1 repeats is that the C-terminal C1 repeat, located closest to the DGK catalytic domain, contain a characteristic conserved set of residues in and beyond the core H_2C_6 motif. This set of residues has been termed the 'extended' cysteine rich domain, and may be involved in the recognition/binding of substrate DG [24]. The DgkA C1C motif explicitly fits the extended C1 pattern (Figure 3, dark grey highlights), further supporting the hypothesis that this enzyme functions as a conventional DGK rather than a PKC-like activity.

Biochemical activity of DgkA

A full-length epitope-tagged version of the *dgkA* gene was constructed and the resultant cDNA was subcloned into the vector pTX-FLAG to allow constitutive expression of FLAG-tagged DgkA. Upon transfection into *Dictyostelium* cells, the expressed FLAG-DgkA protein migrates with an apparent mass of 120 kDa (Figure 4A). FLAG-DgkA was immunoprecipitated with anti-FLAG epitope beads (Sigma) and was assayed for DGK activity using an assay described previously [19]. A control immunoprecipitation from non-transfected *Dictyostelium* cells shows no DGK activity, while the immunoprecipitate from FLAG-DgkA *Dictyostelium* cells revealed the presence of robust DGK activity (Figure 4B).

Expression and locus organization of *dgkA*

Northern-blot analysis was performed with RNA harvested from growth-phase cells and cells collected during development. A single message of approx. 3.0–3.5 kb was detected (Figure 5). This message was detected at all growth stages, but expression was significantly up-regulated in the 12–24 h time points of development.

Because ongoing progress towards completion of the *Dictyostelium* genome project has become available, it is now possible to identify an assembled genome project contig (JC2a94d04) that spans the entire *dgkA* locus. This contig was evaluated with respect to positions of restriction sites. This analysis reveals restriction sites within and around the *dgkA* gene, as indicated in Figure 6. Predicted restriction-fragment sizes determined for several enzymes all match observed fragment sizes for each of the genomic restriction digests analysed by Southern-blot analysis in the original molecular characterization of the MHC-PKC cDNA [16]. The earlier Southern analysis was performed with a segment of the MHC-PKC cDNA that is now recognized as encoding the DGK-like catalytic domain. The clear identification of only one hybridizing segment of DNA in the original characterization further suggests that *Dictyostelium* contains only a single DGK gene, and that the correct structure of this locus is as reported here. In addition, extensive BLAST searches of the nearly complete *Dictyostelium* genome database did not reveal any other genes sharing significant similarity with the catalytic domain of *dgkA*.

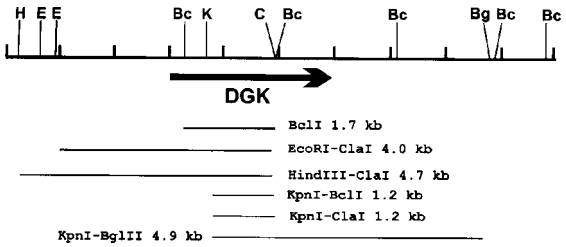


Figure 6 Restriction map of the genomic locus of the *dgkA* gene derived from the *Dictyostelium* genome project, contig JC2a94d04

H, *Hin*dIII; E, *Eco*RI; Bc, *Bcl*I; K, *Kpn*I; C, *Cla*I; Bg, *Bgl*II. Calculated restriction-digest patterns correspond to digests described previously for the MHC-PKC gene locus [16].

DISCUSSION

The *dgkA* gene described here appears to be the only gene in *Dictyostelium* that contains a DGK-like catalytic domain, based on genomic database analysis, Northern blotting and previous Southern blot analysis. Biochemical analysis of DgkA, expressed as a FLAG-tagged protein in *Dictyostelium*, provides direct evidence for its ability to phosphorylate DG. The strong similarity with mammalian θ DGK isoforms is intriguing, and may provide hints as to the functions of the DgkA protein. Previous studies in rat small arteries have demonstrated translocation of DGKθ to the plasma membrane in response to noradrenaline, but not angiotensin II [26], suggesting a role for this enzyme in regulating DG and PA levels during noradrenaline receptor activation. DGKθ activation, but not translocation, was furthermore found to be dependent on activation of phosphoinositide 3-kinase (PI-3K). It was also found that DGK activity could be co-immunoprecipitated with protein kinase B (Akt/PKB) in this setting, although the DGK isoform was not identified. It is noteworthy that the PI-3K and Akt/PKB pathways are critically involved in cell polarity and actomyosin organization during chemotaxis in *Dictyostelium* [27–29]. Further studies are needed to determine whether interactions between DgkA and the PI-3K pathway participate in cytoskeletal control in this system.

The relationship between DgkA and the previously reported MHC-PKC is difficult to resolve fully, but we suggest that problems with the cDNA clone originally described as encoding the MHC-PKC enzyme led to the appearance of a domain architecture resembling a PKC. The fact that DGKs were not recognized as a family at the time of the original MHC-PKC cloning probably contributed to this misinterpretation. In addition, at least two short chimaeric inserts are clearly present in the MHC-PKC cDNA entry in GenBank, which probably also contributed to misinterpretation of the protein structure. Nucleotides 1–149 of the MHC-PKC cDNA (GenBank accession no. M93933) do not display similarity to the *dgkA* locus. In BLAST searches performed against all GenBank sequences, this segment does display a stretch of 98 nucleotides that is nearly identical to the *D. discoideum* EF1-I gene, encoding elongation factor 1α. Within the segment of MHC-PKC reported to resemble a PKC catalytic domain there also appears to be a segment of DNA that is chimaeric, in that nucleotides 1800–2280 of MHC-PKC are not present in the *dgkA* locus. BLAST searches performed with this segment of the MHC-PKC do not reveal significant similarity to GenBank entries from *Dictyostelium* or from any other source. The regions of the MHC-PKC sequence surrounding this block display strong similarity but not identity with the *dgkA* locus, and scattered single nucleotide differences in these flanking regions create several phase-shift disagreements between the two sequences.

Although there appear to be errors in the original MHC-PKC cDNA sequence, it is intriguing that gene-targeting studies performed with that cDNA resulted in clear cytoskeletal defects. Based upon Southern blot analysis, the gene-targeting construct made with the MHC-PKC cDNA did appear to target to the *dgkA* locus and disrupt the *dgkA* gene [5]. These knockout cells were reported to accumulate a dense ring of myosin II filaments at the cell cortex and to have substantially more myosin II associated with the Triton-insoluble cytoskeleton than control cells. [5]. These cells also displayed aberrant fruiting body formation. This latter phenotype is unlikely to result solely from myosin II overassembly, as cell lines that express mutant forms of myosin II that cannot be phosphorylated on the heavy chain ($3 \times$ ALA myosin) display severe myosin II overassembly but still form relatively normal fruiting bodies [6].

Although the ambiguity regarding the cDNA clone used in the earlier studies complicates a definitive conclusion, the results of the gene-targeting studies point towards a possible role of the DGK catalytic domain functions of DgkA as an upstream regulator of myosin II assembly control. If the MHCK purification, antibody production and cDNA library screening strategy that was used to originally isolate MHC-PKC was successful, then it may be concluded that the strongly conserved DGK-type catalytic domain of DgkA must have protein kinase activity in addition to DGK activity, and be capable of directly phosphorylating myosin II. Although there is no precedence from other systems for DGKs to display protein kinase activity, biochemical analysis performed with recombinant DgkA will be necessary to test this possibility. Alternatively, if *dgkA* is not the gene encoding the originally isolated MHCK activity, it is possible that DgkA may act upstream of MHCKs or MHC phosphatases during chemoattractant responses, to activate the localized assembly and recruitment of myosin II to the cytoskeleton that is critical for polarization and efficient migration. Based upon earlier studies in mammalian systems with DGKθ [26], and studies in *Dictyostelium* [27], we suggest that DgkA may function in a regulatory pathway that includes PI-3K and Akt/PKB during this process. Further studies with a full-length *dgkA* cDNA will be necessary to clarify fully the role of this enzyme in cytoskeletal organization and myosin II function.

We thank Jim Spudich and Hans Warrick for positive input during the course of this work. This analysis was supported by Canadian Institutes of Health Research grant MOP8603 to G.P.C., National Science Foundation grant MCB-0110810 to J.L.S., National Institutes of Health (NIH) grant GM50009 to T.T.E., and Comunidad Autonoma de Madrid grant 08.3/0022/2000-2 and Ministerio de Ciencia y Tecnologia grant BMC2001-1066 to I.M. We also thank the *Dictyostelium* Genome Project Consortium (http://dictybase.org/) for providing instant access to random shotgun sequences of the genome project. The sequencing and the analysis of the genome of *Dictyostelium discoideum* is an international collaboration between the University of Cologne, Cologne, Germany (http://www.uni-koeln.de/dictyostelium/), the Institute of Molecular Biotechnology, Jena, Germany (http://genome.imb-jena.de/dictyostelium/), the Baylor College of Medicine, Houston, TX, U.S.A. (http://dictygenome.bcm.tmc.edu/) and the Sanger Centre, Hinxton, Cambs., U.K. (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D-discoideum/). The genome project is funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, the NIH, the Medical Research Council and the EC.

REFERENCES

1 Kanoh, H., Yamada, K. and Sakane, F. (2002) Diacylglycerol kinases: emerging downstream regulators in cell signaling systems. J. Biochem. (Tokyo) **131**, 629–633
2 van Blitterswijk, W. J. and Houssa, B. (2000) Properties and functions of diacylglycerol kinases. Cell Signal. **12**, 595–605

3 Topham, M. K. and Prescott, S. M. (1999) Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. J. Biol. Chem. **274**, 11447–11450
4 Thanos, C. D. and Bowie, J. U. (1996) Developmentally expressed myosin heavy-chain kinase possesses a diacylglycerol kinase domain. Protein Sci. **5**, 782–785
5 Abu-Elneel, K., Karchi, M. and Ravid, S. (1996) *Dictyostelium* myosin II is regulated during chemotaxis by a novel protein kinase C. J. Biol. Chem. **271**, 977–984
6 Egelhoff, T. T., Lee, R. J. and Spudich, J. A. (1993) *Dictyostelium* myosin heavy chain phosphorylation sites regulate myosin filament assembly and localization *in vivo*. Cell **75**, 363–371
7 Vaillancourt, J. P., Lyons, C. and Côté, G. P. (1988) Identification of two phosphorylated threonines in the tail region of *Dictyostelium* myosin II. J. Biol. Chem. **263**, 10082–10087
8 Sabry, J. H., Moores, S. L., Ryan, S., Zang, J. H. and Spudich, J. A. (1997) Myosin heavy chain phosphorylation sites regulate myosin localization during cytokinesis in live cells. Mol. Biol. Cell **8**, 2605–2615
9 Côté, G. P., Luo, X., Murphy, M. B. and Egelhoff, T. T. (1997) Mapping of the novel protein kinase catalytic domain of *Dictyostelium* myosin II heavy chain kinase A. J. Biol. Chem. **272**, 6846–6849
10 Futey, L. M., Medley, Q. G., Côté, G. P. and Egelhoff, T. T. (1995) Structural analysis of myosin heavy chain kinase A from *Dictyostelium*. Evidence for a highly divergent protein kinase domain, an amino-terminal coiled-coil domain, and a domain homologous to the β-subunit of heterotrimeric G proteins. J. Biol. Chem. **270**, 523–529
11 Clancy, C. E., Mendoza, M. G., Naismith, T. V., Kolman, M. F. and Egelhoff, T. T. (1997) Identification of a protein kinase from *Dictyostelium* with homology to the novel catalytic domain of myosin heavy chain kinase A. J. Biol. Chem. **272**, 11812–11815
12 Luo, X., Crawley, S. W., Steimle, P. A., Egelhoff, T. T. and Côté, G. P. (2001) Specific phosphorylation of threonine by the dictyostelium myosin II heavy chain kinase family. J. Biol. Chem. **276**, 17836–17843
13 Liang, W., Licate, L., Warrick, H., Spudich, J. and Egelhoff, T. (2002) Differential localization in cells of myosin II heavy chain kinases during cytokinesis and polarized migration. BMC Cell Biol. **3**, 19
14 Ryazanov, A. G., Pavur, K. S. and Dorovkov, M. V. (1999) Alpha-kinases: a new class of protein kinases with a novel catalytic domain. Curr. Biol. **9**, R43–R45
15 Ravid, S. and Spudich, J. A. (1989) Myosin heavy chain kinase from developed *Dictyostelium* cells. Purification and characterization. J. Biol. Chem. **264**, 15144–15150
16 Ravid, S. and Spudich, J. A. (1992) Membrane-bound *Dictyostelium* myosin heavy chain kinase: a developmentally regulated substrate-specific member of the protein kinase C family. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**, 5877–5881
17 Nellen, W., Datta, S., Reymond, C. D., Sivertsen, A., Mann, S., Crowley, T. and Firtel, R. A. (1987) in *Dictyostelium discoideum*: Molecular Approaches to Cell Biology (Spudich, J. A., ed.), pp. 67–100, Academic Press, London
18 Steimle, P. A., Naismith, T., Licate, L. and Egelhoff, T. T. (2001) WD repeat domains target *Dictyostelium* myosin heavy chain kinases by binding directly to myosin filaments. J. Biol. Chem. **276**, 6853–6860
19 Flores, I., Casaseca, T., Martinez, A., Kanoh, H. and Merida, I. (1996) Phosphatidic acid generation through interleukin 2 (IL-2)-induced alpha-diacylglycerol kinase activation is an essential step in IL-2-mediated lymphocyte proliferation. J. Biol. Chem. **271**, 10334–10340
20 Goldberg, J. M., Bosgraaf, L., Van Haastert, P. J. and Smith, J. L. (2002) Identification of four candidate cGMP targets in *Dictyostelium*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **99**, 6749–6754
21 Hurley, J. H., Newton, A. C., Parker, P. J., Blumberg, P. M. and Nishizuka, Y. (1997) Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. Protein Sci. **6**, 477–480
22 van Blitterswijk, W. J. and Houssa, B. (1999) Diacylglycerol kinases in signal transduction. Chem. Phys. Lipids **98**, 95–108
23 Houssa, B., Schaap, D., van der, W. J., Goto, K., Kondo, H., Yamakawa, A., Shibata, M., Takenawa, T. and van Blitterswijk, W. J. (1997) Cloning of a novel human diacylglycerol kinase (DGKθ) containing three cysteine-rich domains, a proline-rich region, and a pleckstrin homology domain with an overlapping Ras-associating domain. J. Biol. Chem. **272**, 10422–10428
24 Houssa, B. and van Blitterswijk, W. J. (1998) Specificity of cysteine-rich domains in diacylglycerol kinases and protein kinases C. Biochem. J. **331**, 677–679
25 Levi, S., Polyakov, M. and Egelhoff, T. T. (2000) Green fluorescent protein and epitope tag fusion vectors for *Dictyostelium discoideum*. Plasmid **44**, 231–238
26 Walker, A. J., Draeger, A., Houssa, B., van Blitterswijk, W. J., Ohanian, V. and Ohanian, J. (2001) Diacylglycerol kinase θ is translocated and phosphoinositide 3-kinase-dependently activated by noradrenaline but not angiotensin II in intact small arteries. Biochem. J. **353**, 129–137
27 Chung, C. Y., Potikyan, G. and Firtel, R. A. (2001) Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKa. Mol. Cell **7**, 937–947
28 Firtel, R. A. and Chung, C. Y. (2000) The molecular genetics of chemotaxis: sensing and responding to chemoattractant gradients. Bioessays **22**, 603–615
29 Chung, C. Y. and Firtel, R. A. (1999) PAKa, a putative PAK family member, is required for cytokinesis and the regulation of the cytoskeleton in *Dictyostelium discoideum* cells during chemotaxis. J. Cell Biol. **147**, 559–576

Received 1 July 2002/20 September 2002; accepted 24 September 2002
Published as BJ Immediate Publication 24 September 2002, DOI 10.1042/BJ20021027

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 278, No. 37, Issue of September 12, pp. 35629–35635, 2003
Printed in U.S.A.

Regulation of Diacylglycerol Kinase α by Phosphoinositide 3-Kinase Lipid Products*

Received for publication, May 29, 2003
Published, JBC Papers in Press, June 27, 2003, DOI 10.1074/jbc.M305635200

Angel Ciprés‡, Silvia Carrasco§, Ernesto Merino¶, Ernesto Díaz¶, U. Murali Krishna‖, John R. Falck‖, Carlos Martínez-A, and Isabel Mérida**

From the Department of Immunology and Oncology, National Center for Biotechnology, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain and the ‖Department of Biochemistry, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas 75390

Diacylglycerol kinase α (DAGKα), like all type I DAGKs, has calcium regulatory motifs that act as negative regulators of enzyme activity and localization. Accordingly, DAGKα is activated by phospholipase C-coupled receptors in a calcium-dependent manner. One of the first functions attributed to DAGKα in lymphocytes was that of regulating interleukin 2-induced cell cycle entry. Interleukin-2 nonetheless exerts its action in the absence of cytosolic calcium increase. We have studied alternative receptor-derived signals to explain calcium-independent DAGKα activation, and show that DAGKα is stimulated by Src-like kinase-dependent phosphoinositide 3 kinase (PI3K) activation in lymphocytes. Our results demonstrate that, *in vivo*, the increase in cellular levels of PI3K products is sufficient to induce DAGKα activation, allowing DAGKα relocation to the intact lymphocyte plasma membrane. This activation is isoform-specific, because other type I DAGKs are not subject to this type of regulation. These studies are the first to describe a pathway in which, in the absence of receptor-regulated calcium increase, DAGKα activation and membrane localization is a direct consequence of PI3K activation.

Diacylglycerol kinases (DAGK)[1] are a family of enzymes that phosphorylate diacylglycerol (DAG) to generate phosphatidic acid (PA). Activation of these enzymes can modify the balance between the two lipids, both of which have important second messenger functions. Nine DAGK isoforms have been characterized in mammalian cells; all have a conserved catalytic domain and at least two cysteine-rich, C1-like domains of unknown function. DAGK family members are grouped into five subtypes based on the presence of additional regulatory domains in their primary sequences (1). The existence of different regulatory motifs in DAGK primary sequences suggests that these enzymes are regulated by distinct mechanisms.

DAGKα, a type I DAGK, is expressed mainly in neuronal tissues and leukocytes of the lymphoid lineage. The type I enzymes are the only DAGKs that possess a pair of Ca^{2+}-binding EF-hands (2) as well as a recoverin homology domain (3) at the N-terminal region as a characteristic regulatory domain. Accordingly, DAGKα is stimulated *in vitro* by Ca^{2+}, as predictably will be the other two isoforms of this class (4). The recoverin homology domain and the EF-hands appear to act as a single domain with inhibitory properties, as deletion of the Ca^{2+}-regulated DAGKα N-terminal domain generates a constitutively active enzyme (3, 4) that localizes to the plasma membrane in the absence of stimulus (5). This suggests that the receptor-dependent increase in cytosolic Ca^{2+} concentration provokes a conformational change in DAGKα that releases the inhibitory effect of this region and enables enzyme interaction with cell membranes. Data from several laboratories indicate that DAGKα is a cytosolic protein that translocates to the plasma membrane following stimulation of certain receptors known to activate phospholipase C (5, 6). At the membrane, the protein acts by down-modulating phospholipase C-generated DAG levels. In lymphoid cells, for instance, DAGKα acts downstream of the T cell receptor as a negative regulator of the DAG generated during T cell activation (5).

Cytosolic Ca^{2+} elevation is not the only mechanism by which DAGKα is activated in response to receptor triggering. DAGKα activity increases shortly after IL-2 binding (7), and DAGKα-mediated PA generation is essential for IL-2-regulated cell cycle entry (8). IL-2 nonetheless exerts its functions in the absence of phospholipase C-mediated Ca^{2+} increases (9), suggesting alternative DAGKα activation mechanisms. The IL-2 receptor (IL-2R) is composed of three subunits, two of which (β and γc) belong to the cytokine receptor superfamily. Although lacking intrinsic tyrosine kinase activity, IL-2 binding to its high affinity receptor activates cytosolic Src and Jak tyrosine kinases (10). These kinases phosphorylate tyrosine residues in the β and γc subunits, as well as other cytosolic proteins including p85, the regulatory subunit of PI3K type I (11). IL-2-mediated PI3K activation is essential for cell cycle entry as well as for induction of anti-apoptotic signals (12). In addition, IL-2-mediated PI3K induction up-regulates p70S6 kinase activity, which phosphorylates the 40 S ribosomal subunit S6 and thereby controls translation of certain mRNAs crucial for cell division (13).

Studies in non-lymphoid cells suggest that Src family tyrosine kinases can provide regulatory signals important for

* This work was supported in part by Spanish Ministry of Science and Technology Grant BMC2001-1066 and the Community of Madrid Grant 08.3/0022/2000 (to I. M.) and National Institutes of Health Grant GM31278 (to J. R. F.). The Department of Immunology and Oncology was founded and is supported by the Spanish Council for Scientific Research (CSIC) and by Pfizer. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Community of Madrid postdoctoral fellow.
§ Fellow of the Spanish Ministry of Education.
¶ Fellows of the Spanish Ministry of Science and Technology.
** To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-5854849; Fax: 34-91-3720493; E-mail: imerida@cnb.uam.es.

[1] The abbreviations used are: DAGK, diacylglycerol kinase; DAG, diacylglycerol; PA, phosphatidic acid; PI, phosphoinositides; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; HA, hemagglutinin; IL, interleukin; PH, pleckstrin homology; RFP, red fluorescent protein; PBS, phosphate-buffered saline; PI-3,4-P_2, phosphoinositide 3,4-bisphosphate; PI-3,4,5-P_3, phosphoinosite 3,4,5-triphosphate; GFP, green fluorescent protein; PDK-1, phosphoinositide-dependent protein kinase-1.

DAGKα activation. PA synthesis was reported in v-Src-transformed fibroblasts, and DAGK activity was found to co-purify with v-Src (14). More recent studies in epithelial and endothelial cells showed that Src tyrosine kinase activity is required for DAGKα activation in response to hepatocyte growth factor (15). The role of DAGKα and PI3K in the regulation of IL-2-mediated cell proliferation, together with the suggestion of Src kinase-mediated DAGKα activation, prompted us to study in greater detail the possibility of DAGKα regulation by a PI3K-dependent mechanism.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—CTLL-2 cells were obtained from the ATCC. ProB BaF/3 lymphoid cells engineered to express human IL-2Rβ (BaF/3β) were described previously (11). Cells lines were routinely maintained in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 2 mM L-glutamine, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, and either 20 units/ml recombinant IL-2 (generously provided by Hoffman-La Roche, Nutley, NJ) or 5% WEHI-3B cell supernatant as an IL-3 source. Before IL-2 stimulation, cells were washed and resuspended in serum- and cytokine-free medium for 5–6 h. Human leukemic Jurkat T cells were maintained in RPMI supplemented 2 mM L-glutamine. COS-7 cells (ATCC) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (BioWhittaker). All media were supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Invitrogen).

Plasmids and Transfection—Murine DAGKα cDNA fused to a hemagglutinin epitope tag (HA-DAGKα) was subcloned into the pEF vector. The construct encoding an EF-hand deletion mutant of DAGKα fused to green fluorescent protein (EGFP-ΔEFDAGKα) has been described (5). The plasmid encoding p56^{Lck} bearing a mutation of Tyr^{505} to Phe was a kind gift of Dr. A. Carrera. The plasmid encoding the catalytic subunit of PI3K type I fused to the C*AAX* domain has been described (16) and was a generous gift of Dr. J. Downward. The plasmid encoding DAGKβ fused to a FLAG tag was a gift of Dr. H. Kondo. The PH domain of Akt (a gift of Dr. P. Coffer) was subcloned 5′ into the vector encoding the red fluorescent protein (RFP-PH). A plasmid encoding PTEN was a gift of Dr. R. Pulido. For transfection, lymphocytes in logarithmic growth were transfected with 25 μg of plasmid DNA by electroporation at 304 V/975 microfarads. COS cells were transfected with LipofectAMINE (Invitrogen) according to manufacturer's recommendation. Stable HA-DAGKα BaF/3 cells were cultured in complete medium plus Zeocin (100 μg/ml). All experiments were performed 24 h after transfection.

Immunoprecipitation and DAGK Assay—Cells in exponential growth were washed and serum- and IL-2-starved for 5 h at a concentration of 15×10^6 cells/ml. Cells were stimulated with buffer or with 50 units/ml recombinant IL-2. Where indicated, cells were incubated with the PI3K inhibitor LY294002 (Calbiochem) or the Src tyrosine kinase family inhibitor PP2 (Calbiochem) for the last hour of starvation time. Following IL-2 stimulation, cells were collected at the times indicated in the figure legends, and lysed in ice-cold Nonidet P-40 lysis buffer (1% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 mM $Na_4P_2O_7$, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 ng/μl aprotinin, 10 ng/μl leupeptin). Endogenous DAGKα was immunoprecipitated with a polyclonal antibody raised against recombinant mouse DAGKα (GST-DAGKα; residues 130–468). HA-tagged enzyme was immunoprecipitated with anti-HA antibody (Covance). Immunoprecipitation was carried out for 2 h at 4 °C, followed by Gamma-bind Sepharose (1 h, 4 °C). DAGK activity was determined in the immunopellets by measuring radioactive phosphate incorporation into PA as described (7). C8-DAG was used as a substrate. Reactions were performed at room temperature (10 min) before lipid extraction using $CHCl_3$, MeOH, 2 N HCl (20:10:5, v/v/v). Dried radiolabeled lipid products were dissolved in 40 μl of $CHCl_3$/MeOH (1:1, v/v) and applied to silica gel thin layer chromatography plates, with unlabeled C8-PA as a migration standard. Plates were developed in a $CHCl_3$, MeOH, 4 M ammonia solvent system (9:7:2, v/v/v) and autoradiographed. A tenth of the immunoprecipitated protein was analyzed by SDS-PAGE and Western blot with anti-HA antibody.

Western Blot—Immunoprecipitated proteins or total cell lysates were resolved in SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes for Western blot analysis. Proteins were visualized with anti-HA antibody, anti-phospho-Akt (Ser-473; Cell Signaling Technology, Beverly, MA), or anti-Akt (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY).

Lipid Effect on DAGK Activity—HA-DAGKα-expressing BaF/3 cells were serum-starved (5 h), lysed in Nonidet P-40 buffer, and HA-DAGKα was immunoprecipitated with anti-HA antibody. Pellets were washed twice with lysis buffer, once with 0.5 M LiCl, and three times with 10 mM Hepes. The indicated lipids were added as a 10-fold concentrate (1 mM in 5 μl) prepared by sonication in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 min before C8-DAG addition. The phosphorylation reaction was carried out as described (7).

Immunofluorescence Microscopy—Cells were harvested 24 h after electroporation with plasmids, washed, and allowed to attach to poly-L-lysine-coated coverslips (1 h, room temperature). Samples were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS (4 °C, 20 min), permeabilized in PBS, 2% bovine serum albumin, 0.2% Triton X-100, and blocked with 2% bovine serum albumin in PBS (2 h). All subsequent incubations and washes used 0.5% bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100 in PBS buffer; antibodies were incubated (37 °C, 1 h) in a humidified chamber. Nuclei were labeled with Topro-3 (Molecular Probes, Eugene, OR). Fluorescence was analyzed on a Leica confocal microscope (TCS-NT) with associated software.

RESULTS

Lck-dependent DAGKα Activation Is Mediated by a PI3K-dependent Mechanism—Studies in non-lymphoid cells have suggested that Src kinase activation is required for hepatocyte growth factor induction of DAGKα (15). p56^{Lck} is a Src-like tyrosine kinase known to mediate IL-2 receptor signals. We used a plasmid encoding murine DAGKα fused to a hemagglutinin epitope tag (HA-DAGKα) to monitor Lck-dependent DAGKα activation. Transfection of a constitutive active form of p56^{Lck} (p56^{Lck505}) in the BaF/3 proB cell line greatly increased the enzymatic activity of immunoprecipitated DAGKα (Fig. 1*A*). In lymphocytes, activation of cytosolic Src-like tyrosine kinases (p56^{Lck} and p59^{Fyn}) is a rapid result of IL-2 binding to its high affinity receptor (16). It has been proposed that activation of this family of tyrosine kinases is, in turn, closely related to IL-2-induced activation of type I PI3K (11). We observed that p56^{Lck}-mediated DAGKα activation was markedly reduced by treatment of the cells with the PI3K inhibitor LY294002, (Fig. 1*A*) suggesting that the p56^{Lck}-induced DAGKα activation was in some way mediated by a PI3K-dependent mechanism.

A direct effect of PI3K on DAGKα activity was next determined by measuring enzyme activity in cells transiently transfected with a constitutively active, membrane-targeted PI3K mutant (p110 C*AAX*) (17). The increase in DAGKα activity under these conditions confirmed DAGKα activation by a PI3K-dependent mechanism (Fig. 1*B*). As is the case for other lipid kinases, DAGKα is found in the cytosol of lymphocytes and must relocalize to membranes to exert its functions (5). We analyzed the correlation between DAGKα activation by constitutively active forms of p56^{Lck} and PI3K and the subcellular localization of the protein in intact cells (Fig. 1*C*). As previously reported for Jurkat T lymphocytes (5), DAGKα was found in the cytosol of BaF/3 cells in the absence of additional signals. Co-transfection of constitutively active p56^{Lck} and PI3K forms induced enzyme relocalization to the plasma membrane.

DAGKα Is Activated by PI3K Lipid Products—The previous experiments suggested a mechanism that regulates DAGKα in response to PI3K activation. *In vivo*, PI3K activation following receptor triggering catalyzes PI-4,5-P_2 phosphorylation, generating the intracellular messenger PI-3,4,5-P_3, which is rapidly converted to PI-3,4-P_2 by the SH2-containing inositol phosphatase lipid phosphatases. Generation of these two lipids, phosphorylated at the 3′ position of the inositol ring, induces membrane relocalization and activation of several signaling proteins that bear specific lipid-binding domains (18). By dephosphorylating at the D3 position, the phosphatase PTEN terminates PI3K-dependent signals. PI3K-dependent regulation of DAGKα may thus be a direct consequence of the increase in 3′-phosphorylated lipid products or may be mediated by a PI3K-regulated protein.

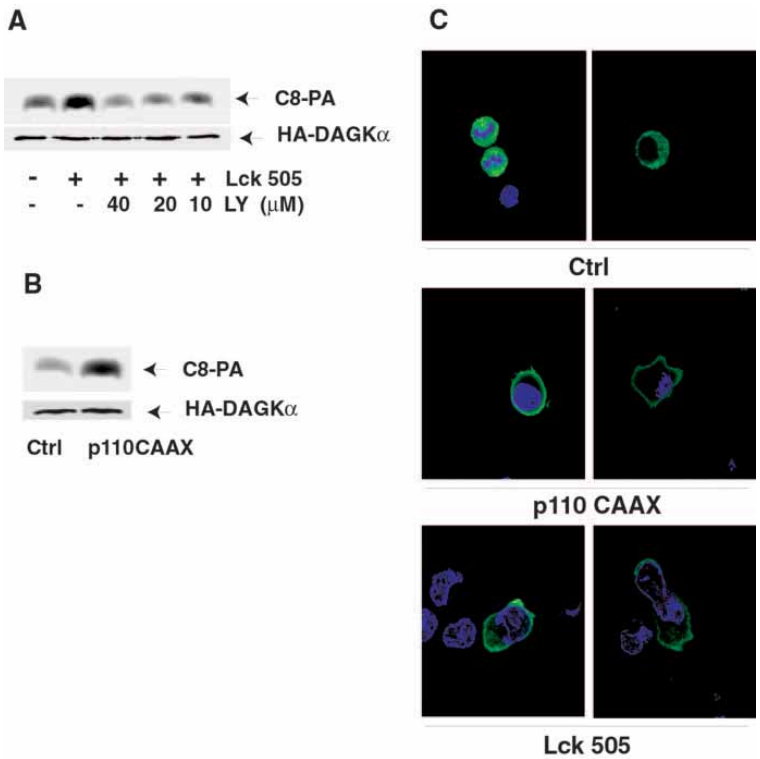


FIG. 1. **Active pp56^{Lck} or PI3K forms induce DAGKα activation and membrane localization.** *A*, BaF/3β cells were stably transfected with DAGKα cDNA fused to a hemagglutinin epitope tag (*HA-DAGKα*). Cells were transiently transfected with empty plasmid (−) or a plasmid encoding a constitutive active form of pp56^{Lck} (Lck505). At 24 h post-transfection, cells were washed and serum-starved for 5 h. During the last 2 h, cells were incubated with LY294002 at the indicated concentrations. DAGK activity was determined in the immunopellets as described ("Experimental Procedures"). A tenth of the immunoprecipitated protein was analyzed by SDS-PAGE and Western blot with anti-HA antibody. One representative experiment is shown of four performed with similar results. *B*, cells expressing HA-DAGKα were transiently transfected with a constitutively active form of PI3K (p110 C*AAX*). After 24 h, cells were washed, serum-starved, and DAGK activity was determined in the pellets. One representative experiment of three is shown. *C*, BaF/3 cells were transiently cotransfected with HA-DAGKα and empty plasmid, p110 C*AAX*, or p56^{Lck505}. After 24 h, cells were serum-starved, fixed, and subcellular DAGKα localization was determined by immunostaining with an anti-HA antibody. Nuclei were visualized using Topro-3.

We analyzed the effect of 3′-phosphorylated lipid addition on DAGKα activity. When immunoprecipitated, HA-DAGKα produced a single band in silver-stained SDS-PAGE gels (not shown). The immunoprecipitated protein was thus used as a source of purified protein to determine enzyme activity after addition of lipid vesicles. Addition of purified PI-4,5-P_2 caused no apparent effect on enzyme activity, whereas vesicles containing PI-3,4,5-P_3 or PI-3,4-P_2 induced a marked increase in DAGKα activity (Fig. 2*A*). The results indicate direct DAGKα regulation by the lipid products of PI3K, excluding nonspecific regulation by negatively charged lipids.

PI-3,4,5-P_3 and PI-3,4-P_2 are synthesized by class I PI3K in response to receptor stimulation. In addition to type I PI3K lipid products, generation of other phosphoinositides is less finely regulated and appears to be implicated in secretion and vesicular trafficking (19). PI-3-P can be generated by PI phosphorylation by class III PI3K or by sequential hydrolysis of PI-3,4,5-P_3 by 4- and 5-phosphatases. Fab1-like kinases in turn phosphorylate PI-3-P to PI-3,5-P_2, which increases in an IL-2-dependent manner in hematopoietic cells (20). Addition of purified PI-3-P and PI-3,5-P_2 did not affect DAGKα activity (Fig. 2*B*), suggesting specific regulation of DAGKα by class I PI3K lipid products.

DAGKα N-terminal Domain Is a Negative Modulator of Enzyme Interaction with PI3K Products in Intact Cells—The DAGKα N-terminal domain contains two Ca^{2+} regulatory elements that act as negative regulatory domains (4, 5). Deletion of the Ca^{2+} regulatory elements in the DAGKα N-terminal domain induces an active enzyme form (ΔEFDAGKα) that is constitutively located at the plasma membrane in the Jurkat leukemic T cell line (5). Jurkat cells are characterized by defective PTEN expression, which results in constitutive membrane localization of the tyrosine kinase Itk via interaction

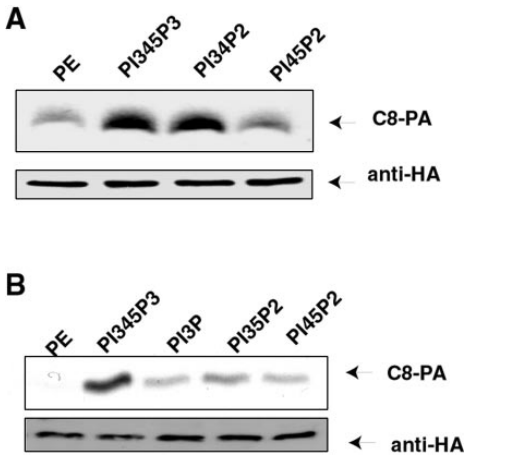


FIG. 2. **DAGKα is activated by PI3K lipid products.** *A*, HA-DAGKα-expressing BaF/3 cells were serum-starved, lysed, and HA-DAGKα immunoprecipitated with anti-HA antibody. The indicated lipids were added as a 10-fold concentrate (1 mM, 5 μl) prepared by sonication in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 min before C8-DAG addition. The phosphorylation reaction was carried out as described under "Experimental Procedures." *B*, enzyme activity was determined as in *A* after addition of vesicles containing the indicated lipids.

through its PH domain (21). Because the previous experiments suggested direct DAGKα interaction with type I PI3K lipid products, we examined whether constitutive ΔEFDAGKα localization to the plasma membrane was a direct result of the elevated PI-3,4,5-P_3 and PI-3,4-P_2 levels in Jurkat cells. As a control for endogenous 3′-phosphorylated lipid levels in these

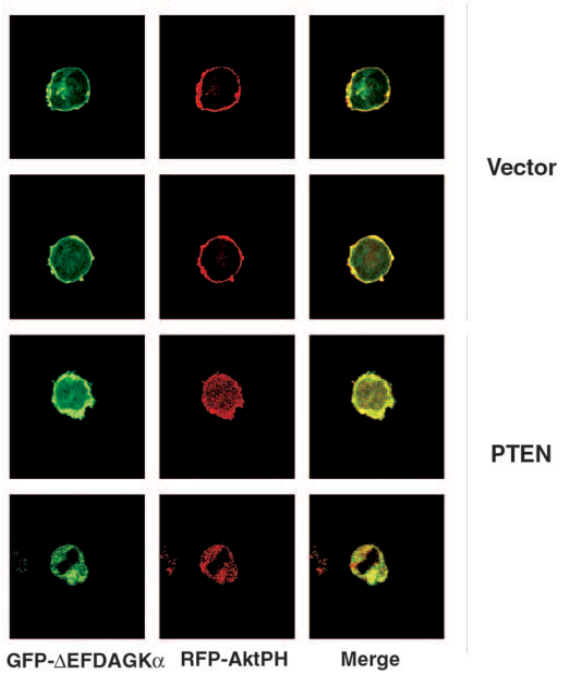


FIG. 3. **DAGKα interacts with D3-phosphorylated lipids in intact cells.** Jurkat cells were transiently cotransfected with a DAGKα deletion mutant lacking the EF-hands fused to the green fluorescent protein (GFP-ΔEFDAGKα) or the Akt PH domain fused to red fluorescent protein (RFP-Akt PH) and wild type PTEN or empty plasmid, as indicated. After 24 h, fluorescent proteins were visualized in fixed cells by confocal microscopy.

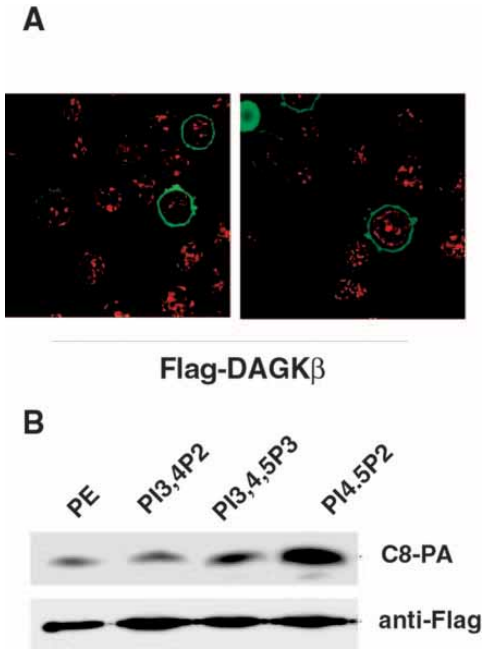


FIG. 4. **DAGKβ is constitutively located at the plasma membrane in intact cells and activated *in vitro* by PI-4,5-P_2.** *A*, BaF/3 cells were transfected with a plasmid encoding DAGKβ fused to a FLAG epitope. After 24 h, cells were fixed and subcellular localization of DAGKβ was determined by confocal microscopy using an anti-FLAG antibody. Nuclei were visualized with Topre-3. *B*, the effect of lipid addition on DAGKβ activity was assessed as described for DAGKα in Fig. 2.

cells, we examined the subcellular localization of a construct expressing the Akt PH domain fused to RFP (RFP-AktPH). As shown for Itk (21), the RFP-AktPH construct was found constitutively associated to the plasma membrane of Jurkat cells in the absence of stimulation (Fig. 3). As we have described (25), ΔEFDAGKα also exhibits plasma membrane localization in these cells. Expression of wild type PTEN caused rapid RFP-AktPH redistribution from the plasma membrane to cytosol; the same was observed for GFP-ΔEFDAGKα (Fig. 3). Two important conclusions can be derived from these studies. The first is that DAGKα interaction with 3′-phosphorylated phosphoinositides takes place in intact cells; the second, that the N-terminal regulatory motif, which governs DAGKα membrane translocation in response to Ca^{2+} elevation, prevents DAGKα binding to 3′-phosphorylated lipids in the absence of stimulus.

Regulation by PI3K Lipid Products Is DAGKα Isoform-specific—Membrane translocation seems a general mechanism for regulation of the three subtype I DAGKs (6). DAGKα and -γ translocate from cytosol to the membrane in response to purinergic receptor stimulation, although the kinetics of the former are more rapid than those of the latter. DAGKγ translocation, which has a classical 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate/DAG-binding C1a domain, is induced by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment of cells. DAGKα, in which the C1a domain is atypical, does not respond to 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Regulation of DAGKβ translocation appears more complex because, in COS cells, this isoform is found at the plasma membrane in the absence of stimulus and relocates to the cytosol only after serum starvation (22).

We examined whether PI3K-dependent regulation can also be extended to other type I subtype isoforms. Because DAGKγ membrane localization appears to be exclusively DAG-dependent (6), we studied DAGKβ subcellular redistribution in lymphoid cells. As described for COS cells (22), DAGKβ is found at the BaF/3 cell plasma membrane in the absence of additional stimuli (Fig. 4*A*). At difference from the case of COS cells, the enzyme remained membrane-bound after an extended starvation period (data not shown). The distinct subcellular localization of DAGKα and -β in unstimulated cells suggests isoform-specific regulation for membrane targeting. We next analyzed DAGKβ activation by phosphorylated PI derivatives. 3′-Phosphorylated lipid addition to immunoprecipitated DAGKβ did not affect enzyme activity; whereas the protein was activated following PI-4,5-P_2 addition (Fig. 4*B*). This indicates that DAGKα regulation by 3′-phosphorylated PI is specific to this isoform, and suggests isotype-specific regulation of type I DAGKs by different phosphorylated PI forms.

IL-2-dependent DAGKα Activation Requires Functional PI3K—Our experiments define a DAGKα regulation mechanism based on PI3K activation. To confirm that this signaling pathway is engaged following agonist stimulation of cells, we examined IL-2-dependent activation of endogenous DAGKα. We generated a polyclonal antibody that immunoprecipitates murine DAGKα (Fig. 5*A*) and used this antibody to examine IL-2-dependent activation of endogenous DAGKα in BaF/3 cells engineered to express the human IL-2Rβ (BaF/3β). These cells proliferate in response to IL-2 and have been used extensively to study IL-2-dependent signals (10). IL-2 addition to BaF/3β cells increased enzyme activity measured in DAGKα immunopellets (Fig. 5*B*). In these experiments, immunoprecipitated protein could not be quantified accurately because of limita-

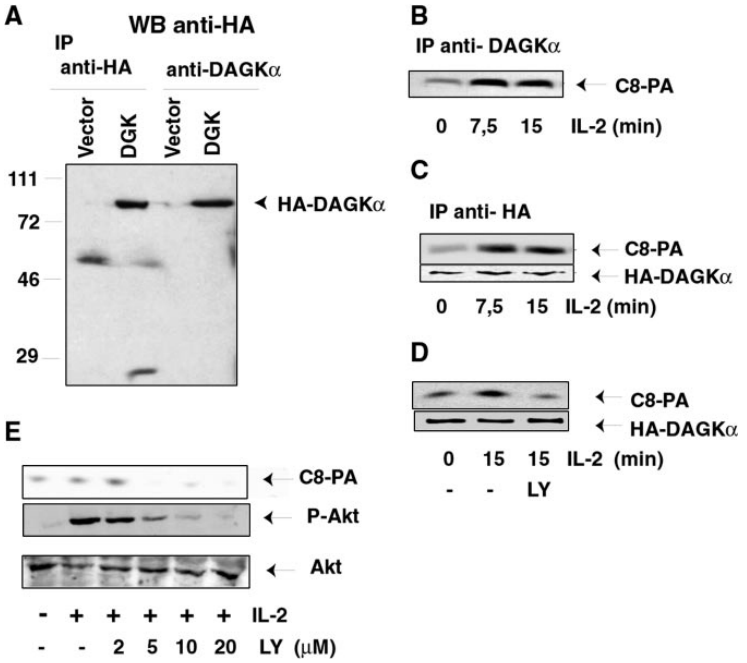


FIG. 5. **IL-2-induced DAGKα activation depends on PI3K activation.** *A*, immunoprecipitation of DAGKα by the anti-DAGKα rabbit polyclonal antibody. COS cells were transfected with empty vector or HA-DAGKα, and lysates were immunoprecipitated with anti-HA or anti-DAGKα antibodies. Immunopellets were washed and analyzed by Western blot with anti-HA antibody. The band corresponding to the 80-kDa DAGKα is shown. *B*, IL-2-dependent activation of endogenous DAGKα was determined by immunoprecipitation from BaF/3β cell lysates using the anti-DAGKα antibody. The lipid kinase assay was performed as described under "Experimental Procedures." An autoradiogram of the TLC shows the radioactivity co-migrating with the C8-PA standard. *C*, BaF/3β cells were transiently transfected with HA-DAGKα. After 24 h, cells were serum-starved and IL-2 stimulated. The tagged enzyme was immunoprecipitated and activity was determined. A tenth of the immunoprecipitated protein was analyzed in SDS-PAGE and Western blot with anti-HA antibody. *D*, BaF/3β cells were HA-DAGKα transfected. After 24 h, cells were serum-starved and, where indicated, incubated with the PI3K inhibitor LY294002 prior to IL-2 stimulation. DAGK activity was determined in the anti-HA pellets. A tenth of the immunoprecipitated protein was analyzed in SDS-PAGE and Western blot with anti-HA antibody. *E*, CTLL-2 cells were pretreated with the indicated concentrations of LY294002 prior to IL-2 stimulation. Activity was determined in DAGKα immunopellets as described under "Experimental Procedures." Prior to immunoprecipitation, cell lysate (20 μg) was resolved in SDS-PAGE and Western blot with antibodies to phospho-Ser473-Akt or Akt.

tions of the antibody for Western blot analysis. We thus used the HA-DAGKα construct to monitor DAGKα activation after IL-2 stimulation. As for the endogenous enzyme, IL-2 addition to transfected BaF/3β cells induced a rapid increase in HA-DAGKα activity confirming IL-2-dependent regulation (Fig. 5*C*). IL-2-dependent DAGKα activation was abolished by treatment with the PI3K inhibitor LY294002 (Fig. 5*D*) suggesting that a functional PI3K is required for enzyme activation. We next examined DAGKα activation in CTLL-2, a murine T cell line that expresses high levels of endogenous IL-2 receptor. As previously shown using total lysates in this cell line (8), IL-2 addition to CTLL-2 cells increased DAGKα activity measured in immunopellets. IL-2-dependent DAGKα activation was completely abolished when cells were pretreated with LY294002 at the same concentrations that prevented Akt phosphorylation (Fig. 5*E*).

As previously shown for hepatocyte growth factor induction of DAGKα in non-lymphoid cells (15), IL-2-dependent DAGKα activation in CTLL2 cells was greatly diminished following PP2 treatment of the cells (Fig. 6*A*). Inhibition of Src-like kinases also prevented IL-2-induced activation of exogenous DAGKα in BaF/3β cells (Fig. 6*B*). The PP2 doses shown to prevent DAGKα activation also inhibited IL-2-induced Akt phosphorylation (Fig. 6*C*). In summary, these results confirm the existence of a signaling pathway in which Src-like kinases regulate DAGKα activation via a PI3K-dependent mechanism.

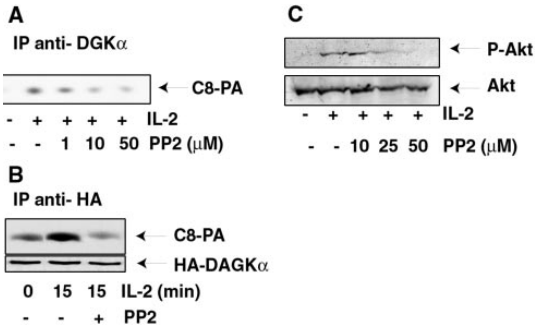


FIG. 6. **IL-2-induced DAGKα activation requires Src-like kinases-dependent PI3K activation.** *A*, CTLL-2 cells were pretreated with the indicated concentrations of PP2 prior to IL-2 stimulation. Activity was determined in DAGKα immunopellets as described under "Experimental Procedures." *B*, BaF/3β cells were HA-DAGKα transfected. After 24 h, cells were serum-starved and, where indicated, incubated with the Src kinase inhibitor PP2. *C*, BaF/3β cells were serum-starved and, where indicated, incubated with the Src kinase inhibitor PP2. After IL-2 stimulation, cell lysate (20 μg) was resolved in SDS-PAGE and Western blot with antibodies to phospho-Ser473-Akt or Akt.

DISCUSSION

Class I PI3K activation by receptor and cytosolic tyrosine kinases is essential for regulation of cell proliferation, survival,

metabolism, cytoskeletal reorganization, and membrane trafficking (18). This lipid kinase can participate in such a large array of cellular functions by activating multiple target molecules, which bear 3′-phosphoinositide-binding domains. Here we describe a novel pathway in which Src kinase-dependent PI3K activation induces DAGKα membrane localization and activation, highlighting the role of this enzyme as another direct effector of PI3K action.

PI3K is activated rapidly following growth factor stimulation, and recent studies have demonstrated direct PI3K regulation by growth factor-induced activation of Src tyrosine kinase (23). In lymphocytes, activation of cytosolic Src-like tyrosine kinases ($p56^{Lck}$ and $p59^{Fyn}$) is a rapid result of IL-2 binding to its high affinity receptor (16). Src tyrosine kinase activation is, in turn, closely related to IL-2-induced activation of type I PI3K. Studies in resting T cells have shown that, in the absence of Jak3 expression, IL-2 activates PI3K through a $p56^{Lck}$-mediated mechanism (24). In activated T cells, full PI3K activation by IL-2 also requires $p56^{Lck}$ (11, 25). The studies presented here confirm, using several approaches, that PI3K lies upstream of DAGK activation and that Src kinase-dependent DAGKα activation is mediated by generation of PI3K lipid products. Although several studies linked tyrosine kinases to receptor-induced DAGKα activation (5, 15), none reported receptor-induced DAGKα phosphorylation on tyrosine residues. Concurring with these results, we do not detect IL-2-dependent tyrosine phosphorylation of endogenous or ectopically expressed DAGKα. Nonetheless, the existence of such a mechanism cannot be disregarded. Additional experiments are currently under way to analyze the existence of rapid, transient DAGKα phosphorylation on tyrosine residues as a consequence of receptor-regulated tyrosine kinase activation. Notwithstanding, and in accordance with the results presented here, it would be of interest to examine the role of PI3K-dependent signaling in DAGKα regulation after triggering of other receptors.

Addition of 3′-phosphorylated lipids activates immunoprecipitated DAGKα, suggesting a direct role for lipid PI3K products in regulating enzyme activity. *In vivo* elevation of 3′-phosphorylated lipids translocates the protein to the membrane in intact cells, suggesting a correlation between DAGKα activation and membrane localization. In agreement with previous studies (7, 15), we show that DAGKα activation can be measured in immunoprecipitates following cell stimulation with IL-2 or co-transfection with active forms of $p56^{Lck}$ or PI3K. Assays in immunoprecipitates are performed in the absence of PI-3,4,5-P_3 or PI-3,4-P_2, suggesting that, once activated, DAGKα is locked into an active conformation that is maintained throughout the immunoprecipitation process. This is reminiscent of the model proposed for Akt and other AGC kinases, in which both lipid binding and phosphorylation by the phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK-1) are required for full activation (26). PDK-1 is a key regulator of PI3K-dependent activation of several substrates which, in some cases, phosphorylates its substrates after direct interaction through the so called hydrophobic motif (27). DAGKα has a partial hydrophobic motif (Phe-*X*-*X*-Phe) at the C terminus, suggestive of PDK-1 interaction. Nonetheless, we did not detect interaction between DAGKα and PDK-1, even after co-transfection with active PI3K (not shown), excluding direct DAGKα-PDK1 interaction. DAGKα phosphorylation was not observed following IL-2 stimulation after *in vivo* ($^{32}P_i$) labeling of the cells (not shown) apparently excluding any PI3K-dependent phosphorylation. PI3K-dependent DAGKα activation thus appears to differ from that described for PDK-1-regulated PI3K effectors.

The primary DAGKα sequence contains distinct conserved domains, none of which corresponds to any of the 3′-phosphorylated binding domains found in PI3K-regulated proteins. This renders it difficult to assign the PI3K-dependent regulation described here to a specific protein domain. The DAGKα N-terminal region contains both a recoverin homology domain and a pair of Ca^{2+}-binding EF-hands shown to act jointly as an autoinhibitory region (3–5). We demonstrate that the constitutive association of the ΔEFDAGKα mutant is reverted by PTEN overexpression, suggesting that membrane association of this truncated mutant is due, at least in part, to the high constitutive levels of 3′-phosphorylated lipids in this cell line. These experiments rule out the N-terminal region as the domain responsible for lipid interaction, and extend the previously reported role of this region as a negative modulator of enzyme activity to that of membrane binding.

Like all DAGKs, DAGKα also contains a pair of C1-like domains of unknown function. Based on their primary sequence, the two DAGKα C1 domains can be classified as atypical, similar to those found in proteins such as atypical protein kinase C isoforms, the proto-oncogenes *raf-1* and *Vav*, and in proteins implicated in small G-protein-dependent signaling, including ROCK, Citron, and Lfk (28). There is no clear function assigned to this type of domain, although they are suggested to participate in membrane binding through protein-protein and/or protein-lipid interactions. In the case of DAGKα, the disruption of either of the two C1 domains abolishes protein membrane association.[2] Similar results are obtained with other isoforms such as DAGKζ (29), suggesting that these domains are critical in protein-membrane interaction. We tried to investigate the translocation of GFP-tagged DAGKα C1 domains to the membrane in response to PI3K elevation, but this construct is not correctly expressed in mammalian cells. This suggests that, as shown for the atypical C1 domains in Raf-1 or Vav, this conserved region does not act as a membrane targeting module on its own.

Studies in other type I DAGK isoforms have shown that the C1 domains, albeit necessary, are not exclusively responsible for membrane localization of DAGK family members. The other two type I DAGK isoforms, β and γ, each contain at least one classical phorbol ester-binding C1 domain, and phorbol ester-dependent membrane translocation has been demonstrated for these two isoforms (6, 22). The characterization of alternative splicing forms of DAGKβ, however, indicates that sequences located at the C-terminal domain are also responsible for membrane localization. Accordingly, the deletion of the 35 last residues in the DAGKβ sequence abolishes its ability to relocate to the membrane after phorbol ester treatment of serum-starved COS cells (22). The data presented here suggest that DAGKβ, which is constitutively associated to the plasma membrane in lymphoid cells, is positively regulated by PI-4,5-P_2. This indicates lipid-based regulation for this isoform in addition to DAG/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-dependent regulation. Further studies should address the potential role of both the C1 domains and the C-terminal sequences in lipid-based regulation of DAGK isoforms.

Membrane translocation is an effective process for regulating DAGK activity and subtype-specific functions. Experiments using GFP-fused chimeric proteins have shown subtype-specific translocation of the three type I DAGKs (α, β, and γ) (6) and also DAGKζ (29). Our experiments here demonstrate that the same isoform is regulated by distinct mechanisms in response to stimulation of different receptors. The existence of more than one mechanism for DAGKα activation would thus

[2] M. A. Sanjuán, D. R. Jones, S. Carrasco, and I. Mérida, manuscript submitted for publication.

define distinct functional roles for this enzyme in receptor-regulated responses. In response to the phospholipase C-derived Ca^{2+} elevation that follows TCR triggering, DAGKα acts as a negative regulator in DAG-mediated responses (5). As a result of IL-2-dependent PI3K activation, DAGKα participates as a positive modulator of PA-regulated signals (8). The precise role of PA in IL-2-dependent cell proliferation has not been fully elucidated, although recent studies linked PA to the regulation of several molecules known to regulate cell proliferation including c-Raf (30), phosphatases (31), and mTOR (32). IL-2-mediated activation of PI3K is required for induction of IL-2-dependent cell cycle entry (33), and is known to mediate mRNA translation through regulation of p70S6 kinase (13). In lymphocytes, PI3K and DAGKα thus emerge as two lipid kinases essential for IL-2-regulated cell proliferation. This is the first report of a functional link between these two enzymes, and future studies should help to characterize the role of DAGKα-mediated PA production in the regulation of PI3K-dependent events such as transductional regulation, cell cycling, and cytoskeletal reorganization. Moreover, the activation of this SrcK/PI3K/DAGKα pathway in response to other agonists known to act in the absence of phospholipase C activation remains to be examined.

Acknowledgments—We thank Drs. T. Taniguchi, W. Greene, J. Downward, A. Carrera, and R. Pulido for gifts of plasmids and reagents, Drs. J. P. Albar and F. Roncal and L. Gómez for preparation of peptides and polyclonal anti-DAGK antibody, C. Mark for excellent editorial assistance, and members of the Mérida lab for critical comments.

REFERENCES

1. Topham, M. K., and Prescott, S. M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 11447–11450
2. Sakane, F., Yamada, K., Kanoh, H., Yokoyama, C., and Tanabe, T. (1990) *Nature* **344,** 345–348
3. Jiang, Y., Qian, W., Hawes, J. W., and Walsh, J. P. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 34092–34099
4. Sakane, F., Masahiro, K., Wada, I., Imai, S., and Kanoh, H. (1996) *Biochem. J.* **318,** 583–590
5. Sanjuan, M. A., Jones, D. R., Izquierdo, M., and Merida, I. (2001) *J. Cell Biol.* **153,** 207–220
6. Schirai, Y., Segawa, S., Kuriyama, M., Goto, K., Sakai, N., and Saito, N. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 24760–24766
7. Flores, I., Casaseca, T., Martinez-A, C., Kanoh, H., and Merida, I. (1996) *J. Biol. Chem.* **271,** 10334–10340
8. Flores, I., Jones, D. R., Cipres, A., Diaz-Flores, E., Sanjuan, M. A., and Merida, I. (1999) *J. Immunol.* **163,** 708–714
9. Mills, G. B., Cheung, R. K., Grinstein, S., and Gelfand, E. W. (1985) *J. Immunol.* **134,** 2431–2435
10. Taniguchi, T., Miyazaki, T., Minami, Y., Kawahara, A. Fujii, H., Nakagawa, Y., Hatakeyama, M., and Liu, Z. J. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **766,** 235–244
11. Merida, I., Williamson, P., Kuziel, W. A., Greene, W. C., and Gaulton, G. N. (1993) *J. Biol. Chem.* **268,** 6765–6770
12. Ahmed, N. N., Grimes, H. L., Bellacosa, A., Chang, O. T., and Tsichlis, P. N. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94,** 3627–3632
13. Reif, K., Burgering, B. M. T., and Cantrell, D. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272,** 14426–14438
14. Sugimoto, Y., Whitman, M., Cantley, L. C., and Erikson, R. L. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81,** 2117–2121
15. Cutrupi, S., Baldanzi, G., Gramaglia, D., Maffe, A., Schaap, D., Giraudo, E., van Blitterswijk, W. J., Bussolino, F., Comoglio, P. M., and Graziani, A. (2000) *EMBO J.* **19,** 4614–4622
16. Taniguchi, T. (1995) *Science* **268,** 251–254
17. Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, P., Wennstrom, S., Warne, P. H., and Downward, J. (1997) *EMBO J.* **16,** 2783–2793
18. Rameh, L., and Cantley, L. C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 8347–8350
19. Czech, M. P. (2000) *Cell* **100,** 603–606
20. Jones, D., González-García, A., Díez, E., Martinez-A, C., Carrera, A. C., and Merida, I. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 18407–18413
21. Shan, X., Czar, M. J., Bunnell, S. C., Liu, P., Liu, Y., Schwartzberg, P. L., and Wange, R. L. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20,** 6945–6957
22. Caricasole, A., Bettini, E., Sala, C., Roncarati, R., Kobayashi, N., Caldara, F., Goto, K., and Terstappen, G. C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 4790–4796
23. Chan, T. O., Rodeck, U., Chan, A. M., Kimmelman, A. C., Rittenhouse, S. E., Panayatou, G., and Tsichlis, P. N. (2002) *Mol. Cell* **1,** 181–191
24. Gonzalez-García, A., Mérida, I., Martinez-A, C., and Carrera, A. C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272,** 10220–10226
25. Migone, T., Rodig, S., Cacalano, N. A., Berg, M., Schreiber, R. D., and Leonard, W. J. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18,** 6416–6422
26. Stokoe, D., Stephens, L. R., Copeland, T., Gaffney, P. R., Reese, C. B., Painter, G. F., Holmes, A. B., McCormick, G., and Hawkins, P. T. (1997) *Science* **277,** 567–570
27. Biondi, R. M., Cheung, P. C., Casamayor, A., Deak, M., Currie, R. A., and Alessi, D. R. (2000) *EMBO J.* **19,** 979–988
28. Hurley, J. H., Newton, A. C., Parker, P. J., Blumberg, P. M., and Nishizuka, Y. (1997) *Protein Sci.* **6,** 477–480
29. Santos, T., Carrasco, S., Jones, D. R., Merida, I., and Eguinoa, A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 30300–30309
30. Rizzo, M. A., Shome, K., Watkins, S. C., and Romero, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 23911–23918
31. Frank, C., Keilhack, H., Opitz, F., Zschornig, O., and Bohmer, F. D. (1999) *Biochemistry* **38,** 11993–12002
32. Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., and Chen, J. (2001) *Science* **294,** 1942–1945
33. Brennan, P., Babbage, J. W., Burgering, B. M. T., Groner, B., Reif, K., and Cantrell, D. (1997) *Immunity* **7,** 679–689

Molecular Biology of the Cell
Vol. 15, 2932–2942, June 2004

Diacylglycerol-dependent Binding Recruits PKCθ and RasGRP1 C1 Domains to Specific Subcellular Localizations in Living T Lymphocytes[V]

Silvia Carrasco and Isabel Merida*

Department of Immunology and Oncology, National Center for Biotechnology, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain

Submitted November 25, 2003; Revised March 13, 2004; Accepted March 17, 2004
Monitoring Editor: Suzanne Pfeffer

Diacylglycerol (DAG) signaling relies on the presence of conserved domain 1 (C1) in its target proteins. Phospholipase C–dependent generation of DAG after T cell receptor (TCR) triggering is essential for the correct immune response onset. Accordingly, two C1-containing proteins expressed in T lymphocytes, Ras guanyl nucleotide-releasing protein1 (RasGRP1) and protein kinase Cθ (PKCθ), were shown to be fundamental for T-cell activation and proliferation. Although containing the same regulatory domain, they are proposed to relocate to distinct subcellular locations in response to TCR triggering. Here we studied intracellular localization of RasGRP1 and PKCθ C1 domains in living Jurkat T cells. The results demonstrate that, in the absence of significant primary sequence differences, the C1 domains of these proteins show specific localization within the cell and distinct responses to pharmacological stimulation and TCR triggering. These differences help explain the divergent localization and distinct functional roles of the full-length proteins, which contains them. The properties of these DAG-binding modules allow their characterization as functional markers that discriminate between DAG pools. Finally, we show that by binding to different diacylglycerol forms, overexpression of distinct C1 modules can attenuate DAG-dependent signals originating from the plasma or internal membranes. This is shown by analyzing the contribution of these two lipid pools to PLC-dependent Ras activation in response to TCR triggering.

INTRODUCTION

Generation of diacylglycerol (DAG) in the plasma membrane in response to T-cell receptor (TCR) triggering is a key signal in the initiation of T-cell activation (Downward *et al.*, 1990). When the receptor is engaged, phospholipase C (PLC) enzymes hydrolyze phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ($PI4,5P_2$) and produce DAG and inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3; Secrist *et al.*, 1991). DAG is recognized by proteins that have conserved domain 1 (C1), whereas IP_3 reaches the endoplasmic reticulum (ER), where it allows calcium release (Kane *et al.*, 2000).

Appropriate TCR-dependent signal intensity and duration is essential for correct progression of the T-cell activation program. PLC-mediated DAG generation is a key signal initiated after TCR triggering, and DAG level modulation alters T-cell activation parameters (Sanjuan *et al.*, 2001). As for other biological systems, protein kinase C (PKC) family members were believed to be the exclusive mediators of all DAG-dependent signals in T cells. In these cells, the novel isoform PKCθ, which is rapidly relocated to the plasma membrane during T-cell activation, is essential for TCR signaling (Monks *et al.*, 1997; Bi *et al.*, 2001; Villalba *et al.*, 2002). PKCθ-deficient mice show normal thymic development but impaired T-cell activation (Sun *et al.*, 2000). In response to increased DAG levels, and modulated by tyrosine phosphorylation, PKCθ translocates to the immune synapse (Diaz-Flores *et al.*, 2003), where it activates c-Jun N-terminal kinase and initiates the nuclear factor-κB cascade (Isakov and Altman, 2002).

The presence in lymphocytes of other DAG-binding proteins such as Ras guanyl nucleotide-releasing protein (RasGRP1; Dower *et al.*, 2000) has recently revealed the essential role of nonkinase DAG-binding proteins in the regulation of TCR-dependent signals. RasGRP are guanine exchange factors (GEF) for Ras family proteins; they contain one C1 domain (Ebinu *et al.*, 1998) and provide a direct link between DAG generation and Ras/Raf/Mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation (Ebinu *et al.*, 2000). Analysis of RasGRP1-deficient mice demonstrated the fundamental role of this protein in thymocyte development (Dower *et al.*, 2000) and correct T-cell expansion (Priatel *et al.*, 2002). TCR triggering induces rapid, DAG-dependent RasGRP1 relocalization to internal membranes (Bivona *et al.*, 2003). Membrane localization of PKCθ and RasGRP thus requires the presence of a C1 domain in their primary sequence; however, the reason for their apparent divergent localization in response to TCR triggering is unknown.

C1 domains were first described as necessary for phorbol ester (PMA, PDBu) binding (Ono *et al.*, 1989; Burns and Bell, 1991); it was later established that they also bind DAG (Quest *et al.*, 1994b) and many related compounds such as bryostatins, indolactams, or merezeins. The C1 domain consists of a conserved 50-amino-acid sequence bearing the motif $HX_{11-12}CX_2CX_{12-14}CX_2CX_4HX_2CX_{6-7}C$ (H, histidine, C, cysteine, X, any amino acid; Hubbard *et al.*, 1991). Three nonconsecutive cysteines and one histidine are in close proximity in the ternary structure, forming two cavities to coordinate one Zn^{2+} ion in each (Hommel *et al.*, 1994). The C1

Article published online ahead of print. Mol. Biol. Cell 10.1091/mbc.E03–11–0844. Article and publication date are available at www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E03–11–0844.

[V] Online version of this article contains supporting material. Online version is available at www.molbiolcell.org.

* Corresponding author. E-mail address: imerida@cnb.uam.es.

domain folds independently of adjacent amino acid sequences, generating a well-characterized structure with a hydrophobic base that interacts with the membrane and is maintained by Zn^{2+} coordination. This base supports two parallel loops that generate a groove between them in which DAG binds, allowing C1 domain insertion in the membrane (Zhang *et al.*, 1995). The residues implicated in DAG interaction have been studied extensively (Quest *et al.*, 1994a; Kazanietz *et al.*, 1995b; Zhang *et al.*, 1995). C1 domains are classified according to these residues, which are conserved in typical C1 domains and are not found in atypical C1 (Hurley *et al.*, 1997).

Eukaryotic cells contain five types of typical DAG-binding proteins, including certain isoforms of diacylglycerol kinases (DAGK; Kanoh *et al.*, 1993), protein kinase D (PKD; Valverde *et al.*, 1994), chimerins (Hall *et al.*, 1990), RasGRP (Ebinu *et al.*, 1998), and munc 13 (Betz *et al.*, 1997). The increase in DAG-regulated protein number and functions suggests a high degree of complexity in the signaling pathways activated by this lipid. Many proteins have atypical C1 domains. The DAGK are the largest family of these proteins (Kanoh *et al.*, 1993); others are vav (Coppola *et al.*, 1991), raf (Ghosh *et al.*, 1994), ROCK (Ishizaki *et al.*, 1996), Citron (Madaule *et al.*, 1995), Lfc (Whitehead *et al.*, 1995), and the recently characterized C1-TEN (Hafizi *et al.*, 2002). The exact role of atypical C1 domains in these proteins remains to be defined, although some studies suggest that they are essential for mediating membrane and/or protein interactions (Clark *et al.*, 1997; Winkler *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000; Booden *et al.*, 2002).

Many laboratories have attempted to establish the affinity of C1 domains for DAG and its analogs (Quest *et al.*, 1994b; Quest and Bell, 1994; Kazanietz *et al.*, 1995a; Slater *et al.*, 1996; Shindo *et al.*, 2001; Irie *et al.*, 2002), to determine the residues essential for binding (Burns and Bell, 1991; Quest *et al.*, 1994a; Kazanietz *et al.*, 1995b) and to evaluate GFP-fused C1 domain translocation in response to phorbol esters and other stimuli (Oancea *et al.*, 1998). Nonetheless, the subcellular localization of C1 domains in response to physiological signals in T lymphocytes has not been studied, nor has the capacity of these domains to alter TCR-dependent signals by blocking DAG increases in distinct subcellular localizations. We isolated C1 domains from PKCθ, RasGRP1, and β2chimerin, typical C1-containing proteins expressed in T lymphocytes, fused them to GFP, and analyzed their intracellular localization in intact lymphocytes. We studied then their response to TCR triggering in the Jurkat cell model to compare it with the localization of the full-length proteins. Our studies reveal that the distinct C1 domains show very different subcellular localization, albeit always dependent on DAG binding. The subcellular distribution of C1 domains after TCR triggering compared with that of the full-length proteins indicate the need for additional signals to ensure correct PKCθ and RasGRP1 localization during T-cell activation. Moreover the study of the TCR-dependent MAPK pathway suggests that, by binding to distinct DAG pools, C1 domains contribute to modulate intensity and duration of Ras-dependent signals in T cells.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine (DPPC), L-α-phosphatidylserine (PS; brain, porcine-sodium salt) and 1,2-dioleyl-*sn*-glycerol (DOG) were from Avanti (Alabaster, AL); 1-stearoyl-2 arachidonoyl-*sn*-glycerol (SAG) was from Biomol (Plymouth Meeting, PA). Orthovanadate, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), poly-DL-lysine, paraformaldehyde, Igepal CA-630 (NP40), propranolol, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), and phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) were from Sigma (St. Louis, MO). Bovine serum albumin (BSA) fraction V, leupeptin, and aprotinin were from Roche (Basel, Switzerland), Tween-20 from Merck (Darmstadt, Germany) and U73122 and Triton X-100 from Calbiochem (San Diego, CA). Chamber slides were purchased from Nunc (Lab-Tek; Rochester, NY), and polystyrene microspheres (15.0 μm) from Polysciences (Eppelheim, Germany). Anti-CD3 and -CD28 antibodies were purchased from BD PharMingen (San Diego, CA), anti-MAPK from Zymed Laboratories (San Francisco, CA), antiphospho-p44/42 MAPK from Cell Signaling Technology (Boston, MA), and anti-PDI was from Stressgen (Victoria, BC, Canada). The anti-giantin-α antibody was a kind gift of Manfred Renz (Inst. Immunology and Molecular Genetics, Karlsruhe, Germany) and anti-lamin B was from Oncogene (Cambridge, MA). Anti-GFP mAb was from Clontech (Palo Alto, CA), horseradish peroxidase–conjugated goat anti-mouse and -rabbit immunoglobulin from Dako (Glostrup, Denmark), and Cy3-conjugated goat anti-mouse and Cy3-goat anti-rabbit were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA).

Plasmids and DNA Constructs

C1 domains were amplified by PCR. For human PKCθ C1a, C1b, and C1a+C1b, we used the PKCθ-EGFP plasmid from Clontech. For RasGRP1 C1, we used a rat RasGRP1 plasmid generously donated by J.C. Stone (Department of Biochemistry, University of Alberta, Canada). For human β2chimerin C1, we used a pEFbosGFPβ2chimerin plasmid, a kind gift of M.G. Kazanietz (Centre for Experimental Therapeutics, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA). Oligonucleotides were designed to amplify the 50 consensus amino acids for C1 domains plus three additional residues each at the N and C termini as well as the restriction sites for subcloning into pEFbosEGFP (modified from pEGFP, Clontech), which were *Xho*I (N terminus) and *Eco*RI (C terminus). Each construct contained the following residues of the full-length proteins: C1aPKCθ : 156–212, C1bPKCθ : 229–284, C1a+C1bPKCθ : 156–284, C1RasGRP1: 540–596, and C1β2chimerin: 357–413. Plasmids with GFP were used for transfection of PKCθ (Clontech) and full-length RasGRP1 (rat RasGRP subcloned in pEGFP, Clontech).

Cell Lines and Transient Transfections

Jurkat cells were maintained in DMEM (BioWhittaker, Walkersville, MD) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma) and 2 mM glutamine (BioWhittaker). Cells (1.2×10^7) in 400 μl of complete medium were transfected by electroporation with 20 μg DNA using a Gene Pulser (270V, 975 μF; Bio-Rad, Hercules, CA). Cells were immediately transferred to 10 ml of growth medium and assayed 24 h later.

Western Blot

Cells were suspended in lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 mM $Na_4P_2O_7$, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP40, 1 mM orthovanadate, 1 mM PMSF, and 10 μg/ml each aprotinin and leupeptin) and incubated on ice (15 min). After centrifugation (15,000 $\times$ *g*, 15 min, 4°C), supernatants were assayed for total protein (DC protein assay, Bio-Rad) and an equivalent amount of protein for each sample was analyzed by SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose, and GFP-coupled construct expression was determined with an anti-GFP mAb and the ECL detection kit (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK).

Vesicle-binding Assay

Lipid vesicles were prepared as described (Sanchez-Pinera *et al.*, 1999), with slight modifications. Briefly, a lipid mixture in chloroform was dried under a nitrogen stream, followed by vacuum (2 h), then resuspended in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 200 μM $CaCl_2$, 0.3 mg/ml BSA) to a final concentration of 400 μM lipid, and vortexed for 50 s. The composition of the multilamellar vesicles generated was DPPC, PS (4:1 mol:mol), and in the cases indicated DOG (2.5 μM) or SAG (2.5 μM).

Jurkat cells were transfected with different C1 constructs and collected 24 h later. Cells were suspended in ice-cold hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaF, 1 mM orthovanadate, 1 mM PMSF, and 10 μg/ml each aprotinin and leupeptin) and incubated on ice (20 min). Cells were lysed by 15 passages through a 30-gauge needle; lysates were centrifuged (15,000 $\times$ *g*, 15 min) to remove nuclei and cell debris. Supernatants were collected and centrifuged (100,000 $\times$ *g*, 30 min, 4°C) to remove all particles. Supernatants were assayed for total protein (DC protein assay, Bio-Rad), and 100 μg of total protein were incubated with lipid vesicles (15 min, room temperature). To isolate vesicle-bound proteins, the mixture was centrifuged (100,000 $\times$ *g*, 30 min), and pellets and supernatants were analyzed by SDS-PAGE. C1 domains levels were analyzed using anti-GFP antibody.

Stimulation with Soluble anti-CD3

Cells were transfected with pEFbosEGFP, EGFPC1a+C1bPKCθ, and EGFPC1RasGRP1 and sorted 24 h later to recover GFP-positive cells (Altra Hypersort, Beckman Coulter, Miami, FL). Cells were maintained 8 h in growth medium, then starved for 1 h in DMEM 1% BSA, and analyzed by flow cytometry (Epics XL-MCL, Beckman Coulter) to calculate the percentage

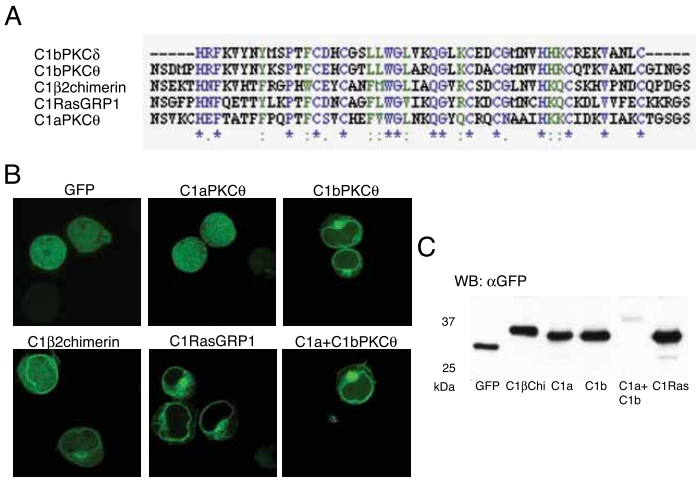


Figure 1. C1 domain constructs and their expression in Jurkat cells. (A) alignment of C1bPKCθ, C1β2chimerin, C1RasGRP1, and C1aPKCθ domains with C1bPKCδ, as an example of a typical C1 domain. *, single, fully-conserved residue, :, highly conservative changes in side groups and ., low conservative changes in side groups. Alignment was done with the Clustal W program using Biology Workbench 3.2 (San Diego Supercomputer Center, University of California, San Diego, CA). (B) In vivo expression of GFP-fused C1 domains in Jurkat cells. Cells were transfected and after 24 h, pelleted and suspended in HBSS for plating on poly-D,L-lysine–coated chamber slides. Slides were mounted on a 37°C plate on the confocal microscope and analyzed. Images are representative of the field observed for each condition. (C) Immunoblot analysis of Jurkat cells transfected with indicated C1 domain constructs. Cells were transfected and processed 24 h later for Western blot (see MATERIALS AND METHODS). Analysis with anti-GFP mAb showed proteins of the predicted molecular weight. C1a+C1bPKCθ was less abundant than the other constructs in all experiments. In flow cytometry analysis, C1a+C1bPKCθ–expressing cells were less numerous and less bright than cells expressing the other constructs.

of GFP-positive cells. For stimulation, cells expressing each construct were separated in six 1.5-ml vials at a final concentration of 1×10^6 cells/ml in HEPES-balanced salt solution (HBSS; 25 mM HEPES KOH, pH 7.4, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 132 mM NaCl, 0.1% BSA) and stimulated with soluble anti-CD3 (1 μg/ml final concentration). Cells were collected at different times and processed for Western blot. PMAPK levels were analyzed using antiphospho-p44/42 MAPK and anti-MAPK antibody to control total protein levels.

Immunofluorescence

At 24 h after transfection, cells were transferred to poly-DL-lysine–coated chamber slides and allowed to attach (15 min), then fixed (10 min) with 2% PFA, washed at least three times with 150 mM Tris-HCl, pH 7.4, permeabilized (10 min) with PBS 0.2% Triton X-100, washed once with PBS, blocked in PBS 1% BSA, and washed three times with PBS. Antibodies were incubated (1 h, room temperature) and washed three times with PBS 0.1% Tween-20. Primary antibodies used were antigiantinα to detect Golgi and antiprotein disulfide isomerase (anti-PDI) for ER. Secondary antibodies were Cy3-anti-rabbit and Cy3-anti-mouse immunoglobulin. Cells were imaged with a laser scanning confocal microscope (TCS-NT, Leica, Wetzlar, Germany) and images processed using ImageJ software.

Confocal Microscopy Imaging

At 24 h after transfection, Jurkat cells were pelleted and suspended in HBSS, then transferred to poly-DL-lysine–coated chamber slides, allowed to attach at 37°C, and maintained at this temperature to record the image time series. Where appropriate, cells were preincubated with U73122 (1 μM, 30 min) before transfer to chamber slides; they were maintained in U73122 throughout the experiment. PMA or PDBu (200 nM) were added to HBSS after the first frame, and images were recorded every 11 s. Propranolol (250 μM) was added in the same conditions, and frames were recorded every 5 s. Cells were imaged with a laser scanning TCS-NT confocal microscope, and images were processed using ImageJ software.

Stimulation with Antibody-coated Microspheres

Antibodies were adsorbed to microspheres by mixing 1 μg antibody (1:1 CD3:CD28) in PBS with 0.5×10^6 microspheres in a final volume of 1 ml and incubated (1.5 h, room temperature) with continuous mixing; 1.5 ml 1% BSA in PBS was added and mixing continued (30 min). Microspheres were washed three times with PBS and suspended in PBS for addition to cells. For stimulation, cells were mixed with antibody-coated microspheres at a 2:1 cell/bead proportion and plated on poly-DL-lysine–coated chamber slides. Images were captured each 15 s by confocal microscopy and processed using ImageJ software.

Fluorescence Recovery after Photobleaching

At 24 h after transfection with GFPC1RasGRP1, Jurkat cells were suspended in HBBS, then transferred to poly-DL-lysine coated chamber slides, allowed to attach at 37°C and maintained at this temperature to record the image time series. For the fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiment, the selected area was exposed to maximum laser power and recovery from bleaching was measured every 500 msec. Images were captured with a laser scanning confocal microscope (LSM510 META, Zeiss, Thornwood, NY) and processed with ImageJ software.

RESULTS

C1 Domain Expression and Localization in Jurkat Cells

To study the role of C1 domains as potential DAG sensors, we cloned some of these domains tagged with GFP to trace them in in vivo time-lapse microscopy. PKCθ C1a and C1b were cloned independently or in tandem, in addition to RasGRP1 C1, and β2chimerin C1. These three proteins are expressed in T lymphocytes, in which DAG levels are under tight control (Sanjuan *et al.*, 2001), and require C1 domains for function. Sequence alignment of C1 domains from these proteins with a well-characterized C1 domain (C1b PKCδ; Kazanietz *et al.*, 1995b; Zhang *et al.*, 1995) showed that all residues necessary for DAG binding are conserved (Kazanietz *et al.*, 1995b; Figure 1A).

We designed primers to amplify the 50 consensus residues described for C1 domains (Hubbard *et al.*, 1991), plus an additional three N-terminal and three C-terminal residues to allow correct protein folding. For C1a+C1bPKCθ, we amplified both C1 domains as well as the residues between them. The GFP is fused at the N-terminus. Constructs with GFP fused at the C-terminus showed the same localization (unpublished data).

Cloned C1 domain expression was analyzed in living Jurkat cells. In Western blot, all constructs migrated according to the predicted molecular weight of the fusion protein and were expressed in large amounts, except the C1a+C1b construct (Figure 1C). Confocal images showed distinct C1 domain localization; C1aPKCθ was distributed homogeneously throughout the cytoplasm and the nucleus. C1bPKCθ localized in some perinuclear regions, as did C1β2chimerin, with a diffuse signal in cytoplasm and the nucleus. C1RasGRP1 appeared to have the same perinuclear spreading and was distributed in a network in cytoplasm. C1a+C1b was found predominantly in the plasma membrane and in the perinuclear region (Figure 1B). Expression in the PAE pig endothelial cell line showed similar localization (unpublished data).

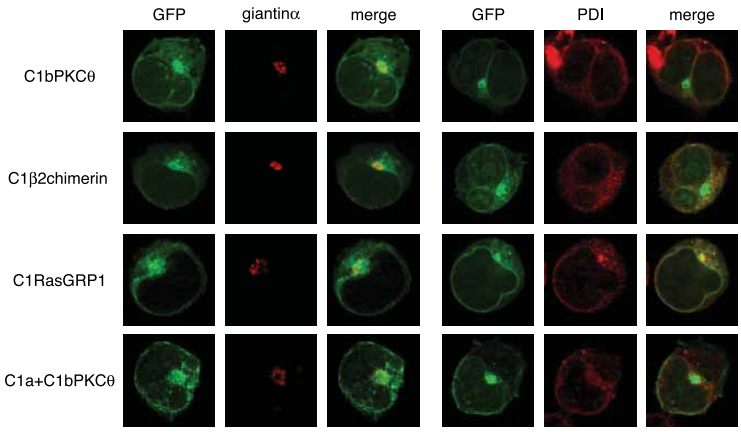


Figure 2. Confocal microscopy analysis of C1 domain internal localization. Jurkat cells transfected with distinct GFP-fused C1 domains were fixed after 24 h and processed (see MATERIALS AND METHODS) to stain Golgi with anti-giantin-α (red, left panels) or ER with anti-PDI (red, right panels). Merged GFP and Cy3 fluorescence is shown.

The Internal Localization of the C1 Domains Correlates with ER and Golgi Staining

To assess C1 domain localization, we used anti-PDI (Ferrari and Soling, 1999) and -giantinα (Seelig *et al.*, 1994) antibodies to detect ER and Golgi, respectively. Although complete colocalization was not observed, the principal accumulation of perinuclear GFP signaling localized to the region of giantinα staining for C1bPKCθ, C1β2chimerin, C1RasGRP1, and C1a+C1bPKCθ (Figure 2). Although PDI staining was perinuclear, GFP appeared to stain a more internal structure that also surrounded the nucleus. Possible explanations may be that PDI stains only the outer ER sacs, whereas the tubules proximal to the nucleus remain unstained, or the GFP constructs may be located in the nuclear membrane (Figure 2). We thus stained the nuclear membrane with an anti-lamin B antibody (Gerace *et al.*, 1978), but again colocalization was not clear (unpublished data). For C1RasGRP1, the netlike arrangement in the cytosol coincided partially with PDI staining. All together, the results point to the association of these four constructs with internal membranes.

Membrane Localization of C1 Domains Is DAG Dependent

Plasma membrane synthesis of new components takes place in ER and Golgi, and DAG is one of the principal substrates

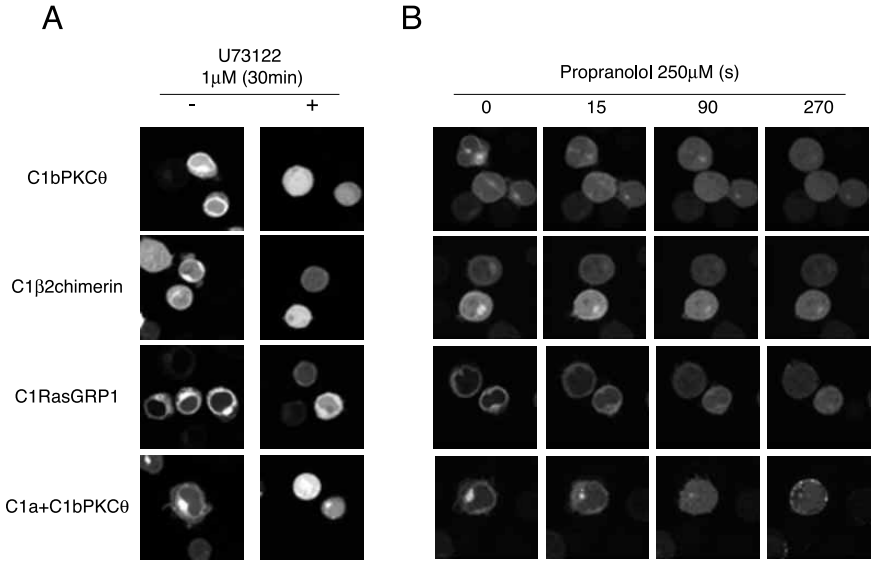


Figure 3. C1 domains change their localization in U73122- or propranolol-treated cells. (A) Cells transfected with GFPC1 constructs alone (−) or treated (+) with U73122 (1 μM, 30 min), were plated and mounted for confocal microscopy as in Figure 1B. Images are representative of a field observed for each condition. (B) Cells transfected with GFPC1 constructs were plated and mounted for confocal microscopy as in Figure 1B. Propranolol (250 μM) was added immediately after the first frame, and images captured every 5 s. Time-lapse confocal recording is shown in Supplementary Videos 1–4. Images at times indicated are shown to illustrate GFPC1 domain subcellular localization.

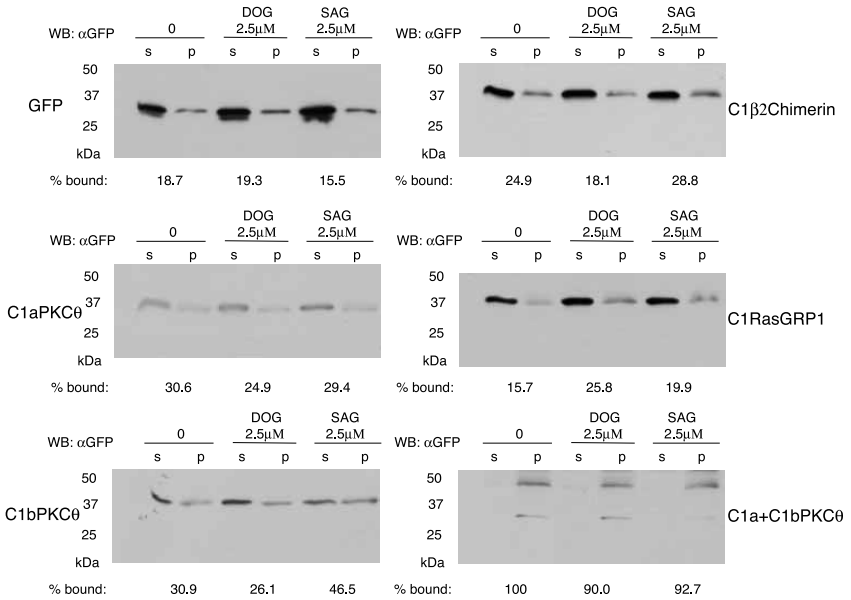


Figure 4. C1 domains bind selectivity to vesicles containing distinct DAG species. DPPC and PS (4:1, mol:mol) vesicles containing no DAG (0), 1,2-dioleyl-*sn*-glycerol (DOG) or 1-stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycerol (SAG) were incubated with lysates from Jurkat cells transfected with different GFPC1 constructs or with GFP (control). Bound protein was recovered by centrifugation and detected by SDS-PAGE and western blot, (p, pellet fraction; s, supernatant fraction). Bands were quantified by densitometry; these values were used to calculate the percentage of membrane-bound protein using the formula %bound = band intensity in p/(band intensity in p + band intensity in s).

for new complex lipid generation (Henneberry *et al.*, 2002). PLC activity can also contribute to DAG generation, hydrolyzing PI4,5P_2 in internal membranes and in plasma membrane. We tested the DAG dependence of specific C1 localization using two inhibitors, U73122 and propranolol.

U73122 is a generic PLC inhibitor (Thompson *et al.*, 1991) that blocks PI4,5P_2 hydrolysis and decreases DAG levels in different subcellular localizations (Rebecchi and Pentyala, 2000). In U73122-treated cells (1 μM, 30 min), C1bPKCθ, C1β2chimerin, and C1a+C1bPKCθ lost their localized expression. C1RasGRP1 decreased its perinuclear signal, although it maintained residual internal localization (Figure 3A).

Propranolol is a specific inhibitor of phosphatidate phosphohydrolase type 1 (PAP1), an enzyme responsible for phosphatidic acid dephosphorylation in cytosol and inner membranes (Roberts *et al.*, 1998), which has been used to block DAG production (Kurscheid-Reich *et al.*, 1995; Baron and Malhotra, 2002). Propranolol addition at a final concentration of 250 μM dissociated C1 domains from internal membranes in <1 min and relocalized them to cytoplasm, except for C1a+C1b, part of which remained in the plasma membrane (Figure 3B and Supplementary Videos 1–4).

Specific Binding of C1 Domains to Lipid Vesicles Is Dependent on DAG Composition

Previous experiments suggested that DAG is essential for C1 domain binding; however, targeting to specific membranes known to differ in their lipid composition (Zinser *et al.*, 1991; Stahelin *et al.*, 2003) suggests a requirement for other lipids. The plasma membrane is enriched in phosphatidylserine and cholesterol, whereas phosphatidylcholine is the principal component of inner membranes. To analyze whether lipid composition was responsible for C1 domain localization, we generated vesicles mimicking inner or plasma membrane (Das *et al.*, 2003). We incubated lysates of transfected Jurkat cells with these vesicles and the protein bound was analyzed by Western blot. Under these conditions, we did not observe differences that would account for specific subcellular localization of C1 domains (unpublished data).

Another explanation for these distributions is C1 domain association with specific DAG pools. In inner membranes, an elevated percentage of DAG contains monounsaturated or saturated fatty acids, whereas in most cases, plasma membrane DAGs have a saturated fatty acid in position 1 of the glycerol chain and an polyunsaturated fatty acid in position 2 (Hodgkin *et al.*, 1998). To simulate these two contexts, we generated multilamellar vesicles with DPPC and PS (4:1, mol:mol) as a platform in which we incorporated DOG (2.5 μM) as an example of inner DAG, and SAG (2.5 μM) as plasma membrane DAG. Lysates of Jurkat cells transfected with C1 domain constructs and GFP (control) were incubated with vesicles (15 min); bound protein was recovered by centrifugation and analyzed by Western blot (Figure 4). Although C1aPKCθ did not appear to associate with membranes in intact cells (Figure 1B), it bound vesicles nonspecifically in vitro. C1bPKCθ pelleted preferentially with plasma membrane DAG vesicles, as did C1β2chimerin, although not to the same extent. Nearly 100% of C1a+C1bPKCθ bound to all vesicle types, showing slightly less binding in the presence of DOG, as seen for C1bPKCθ and C1β2chimerin. In contrast, C1RasGRP1 was the only domain that bound to DOG vesicles with higher affinity than to those containing SAG. These in vitro binding differences could explain specific C1 domain localization due to its capacity to sense DAG pools in intact cells.

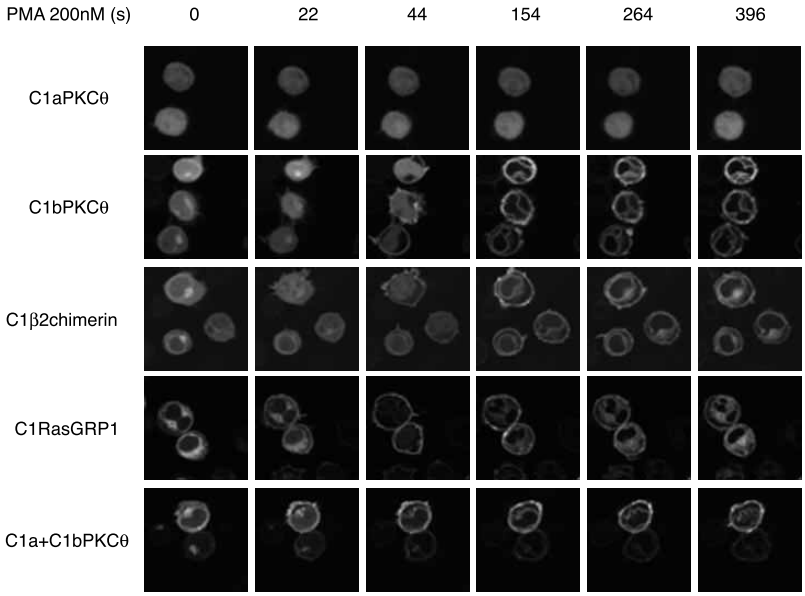


Figure 5. C1β2chimerin, C1bPKCθ, C1a+C1bPKCθ, and C1RasGRP1, but not C1aPKCθ translocate in response to PMA. Cells transfected with GFPC1 constructs were plated and mounted for confocal microscopy as in Figure 1B. PMA (200 nM) was added immediately after the first frame, and images captured every 11 s. Time-lapse confocal recording is shown in Supplementary Videos 5–9. Images corresponding to times indicated show GFPC1 domain translocation.

C1bPKCθ, C1a+C1bPKCθ, C1RasGRP1, and C1β2chimerin Translocate to the Plasma Membrane in Response to PMA; C1aPKCθ Does Not

To confirm that the cloned C1 are typical C1 domains and respond to PMA by changing their localization, we analyzed their response to extracellular addition of PMA (200 nM) by time-lapse videomicroscopy (Supplementary Videos 5–9; Figure 5 shows selected frames from these videos). C1a did not translocate after PMA addition, even at a concentration of 1 mM, much higher than that normally used (unpublished data). Cytoplasm- and inner membrane-associated fractions of C1bPKCθ and C1β2chimerin translocated with similar kinetics to the plasma membrane in <1 min; 1.5 min after PMA addition, the nuclear fraction translocated to nuclear membrane. C1 domains were associated only with cell membranes after 6-min stimulation, with no visible signal in nucleus or cytoplasm. C1RasGRP1 was dissociated from its localization in <1 min and associated with plasma membrane; it later gradually recovered its initial intracellular position. C1a+C1bPKCθ was partially localized in plasma membrane before stimulation; after PMA addition, the remaining cytosolic and Golgi fractions translocated rapidly to plasma membrane, where they were maintained for at least 15 min (unpublished data). The remaining nuclear membrane signal was probably due to the small proportion of the construct in the nucleoplasm that was able to translocate.

When cells were PDBu-stimulated (Supplementary Videos 10–14), C1a did not translocate; the C1bPKCθ, C1β2chimerin, and C1a+C1bPKCθ soluble fractions translocated simultaneously to internal and plasma membranes, with no preference for one or the other. C1RasGRP1 appeared to be unaffected, as it remained in its initial localization in internal membranes and no signal was detected in the plasma membrane.

These differences between PMA and PDBu stimulation are probably due to the less hydrophobic nature and smaller size of PDBu (Oancea *et al.*, 1998), which permits more rapid cell entry and internal membrane localization than PMA. PMA remains trapped in the plasma membrane (Ananthanarayanan *et al.*, 2003), explaining the lack of signal in nuclear membrane until 2 min poststimulation. With time, the inner membranes are saturated with PMA, and equilibrium is established between inner and plasma membranes by 6 min poststimulation.

Although C1RasGRP1 appeared to be tightly associated with inner membranes and no signal was detected in cytosol or nucleoplasm (Figure 1B), experiments with PMA suggest continuous association and disassociation at this site. FRAP studies showed rapid recovery of fluorescence in photobleached perinuclear areas (Figure 6A). We detected new signal 500 msec after photobleaching, which nearly reached initial fluorescence levels in <30 s (Figure 6B). These results show that C1RasGRP1 is not membrane-anchored, but is continuously bound and released from internal membranes.

C1bPKCθ and C1a+C1bPKCθ But Not C1RasGRP1 Translocate to Plasma Membrane in Response to TCR Triggering

Transfected cells were incubated with anti-CD3+CD28–coated microspheres to study C1 domain relocation to the contact site. Cells expressing C1a+C1bPKCθ or C1bPKCθ accumulated GFP signal in the microsphere contact zone, as did the full-length protein (Figure 7A). Recruitment of these C1 domains to the synapse was not sustained, and they dispersed over the cell membrane after a short time; nonetheless, the complete protein was consistently localized at the contact site (Supplementary Videos 15–17; Figure 7B shows selected frames). As for PMA stimulation, C1aPKCθ did not translocate. C1bPKCθ and C1a+C1bPKCθ translocation in response to CD3+CD28 was DAG production dependent, as when cells were preincubated with U73122, C1 domains did not translocate (unpublished data). These results are consistent with previous studies of PKCθ translocation that showed the requirement for DAG, which is detected through its C1 domains, and for other signals that probably maintain correct PKCθ localization by interacting

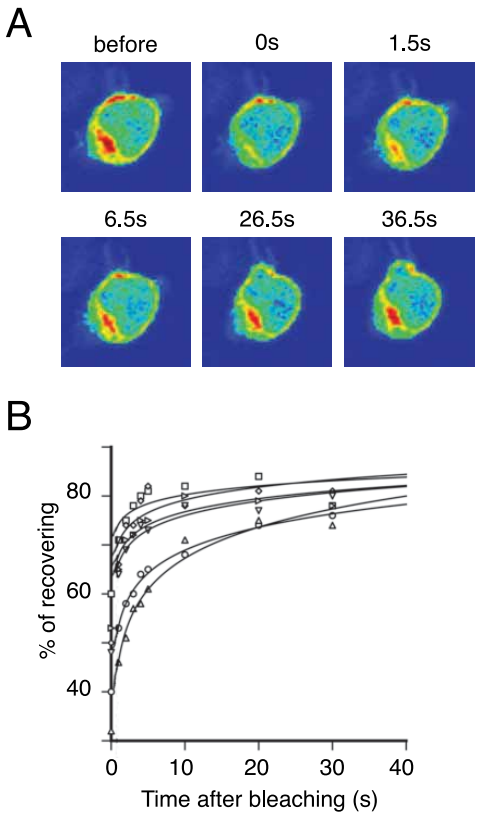


Figure 6. C1RasGRP1 associates and dissociates continuously from internal membranes. Cells transfected with GFPC1RasGRP1 were plated and mounted for confocal microscopy. (A) Perinuclear region was selected and exposed to maximum laser power. Images before and after (at indicated times) photobleaching were captured. Color range: red: maximum GFP fluorescence, blue: minimum GFP fluorescence. (B) Data from six representative experiments were plotted.

with synapse complex proteins (Villalba *et al.*, 2002; Diaz-Flores *et al.*, 2003).

RasGRP1 is a cytosolic protein that also moved from cytosol to the membrane:microsphere contact region (Figure 7C); we observed no Golgi signal in response to anti-CD3+CD28, in contrast to previous reports (Bivona *et al.*, 2003). Under the same conditions, C1RasGRP1 did not translocate. This suggests that, although the isolated RasGRP1 C1 domain has a higher affinity for Golgi, the full-length protein receives additional signals, which render it capable of overriding C1 domain fate.

C1a+C1bPKCθ and C1RasGRP1 Modify Anti-CD3–dependent Ras Signaling

TCR triggering increases DAG levels, promoting Ras activation and subsequent MAPK phosphorylation (Marshall, 1995). Expression of an inactive DAGKα form that does not permit DAG transformation into PA, renders increasing DAG levels and as a consequence, more activated Ras (Jones *et al.*, 2002). We thus considered that C1 domains might modify Ras signaling. We tested whether C1a+C1bPKCθ in plasma membrane or C1RasGRP in internal localizations block the DAG essential for Ras signaling (Bivona and Philips, 2003). Cells transfected with GFP (control), with C1a+C1bPKCθ or C1RasGRP1 were sorted to obtain a 100% GFP-positive population, cultured (8 h), then analyzed by flow cytometry to assess GFP expression and the percentage of positive cells. Both GFP- and C1RasGRP1-transfected cells were 100% GFP positive; however, C1a+C1bPKCθ cells lost construct expression, and the percentage of positive cells varied from 60–80% in distinct experiments. Cells were subsequently starved (1 h) in DMEM with 1% BSA and then stimulated with anti-CD3 (1 μg/ml) for a maximum of 2 h. Cells were recovered at different times and CD3-induced Ras activation was analyzed by PMAPK Western blot (Figure 8). C1a+C1bPKCθ expression decreased the MAPK phosphorylation level, probably because of C1a+C1bPKCθ interaction with DAG produced in response to anti-CD3, causing blockade of DAG connection with effectors as RasGRP1. C1RasGRP1 expression also modulated Ras signaling, although the construct did not translocate to the synapse. Maximum phosphorylation was delayed to 15 min and the signal was decreased at all time points. These results may confirm the recently reported role for RasGRP1 in Ras activation in Golgi (Bivona *et al.*, 2003), where C1RasGRP1 localizes.

DISCUSSION

Although C1 domains have been studied extensively, their response to physiological signals in T lymphocytes has not been established. We used Jurkat T cells transfected with various GFP-fused C1 domains to follow their response to TCR triggering. We selected typical C1 domains of two proteins that are expressed in Jurkat cells, PKCθ (C1aPKCθ, C1bPKCθ, C1a+C1bPKCθ) and RasGRP1 (C1RasGRP1), which control NFκB activation (Isakov and Altman, 2002) and the Ras/Raf/MAPK pathway (Ebinu *et al.*, 2000), respectively. We also cloned the β2chimerin C1 domain (C1β2chimerin) as an example of a C1 domain responsible for ER localization of the full-length protein (Wang and Kazanietz, 2002). β2chimerin is a lymphocytes-expressed (Siliceo, M. and Merida, I., unpublished results) GTPase-activating protein (GAP) for Rac (Diekmann *et al.*, 1991), although its exact role remains unknown.

C1aPKCθ was the only construct that did not behave as predicted for a typical C1 domain, as it did not translocate after PMA or PDBu stimulation. PKC C1a domains are known to have lower affinity for phorbol esters than C1b (Shindo *et al.*, 2001); indeed, the C1a from PKCθ and PKCδ have been described as domains that do not bind DAG (Shindo *et al.*, 2001; Irie *et al.*, 2002). Sequence analysis shows that all residues considered essential for binding are conserved (Kazanietz *et al.*, 1995b). A proline at C1aPKCθ position 9 (considering the first histidine in the domain as position 1) and a glycine at the same position in C1aPKCδ nonetheless appear to be essential, because their mutation to lysine, the amino acid at this position in other C1a domains, renders them able to bind DAG (Shindo *et al.*, 2001). The importance of this residue lies in its position at the base of one of the loops that constitutes the DAG binding groove; a proline or a glycine would modify loop conformation, blocking its correct folding.

Although the C1aPKCθ domain did not bind PMA, as shown here, it increased C1bPKCθ affinity for the plasma membrane, and the combined construct (C1a+C1bPKCθ) was expressed constitutively in plasma membrane. C1a domains are essential for anchoring classical PKC to the cell

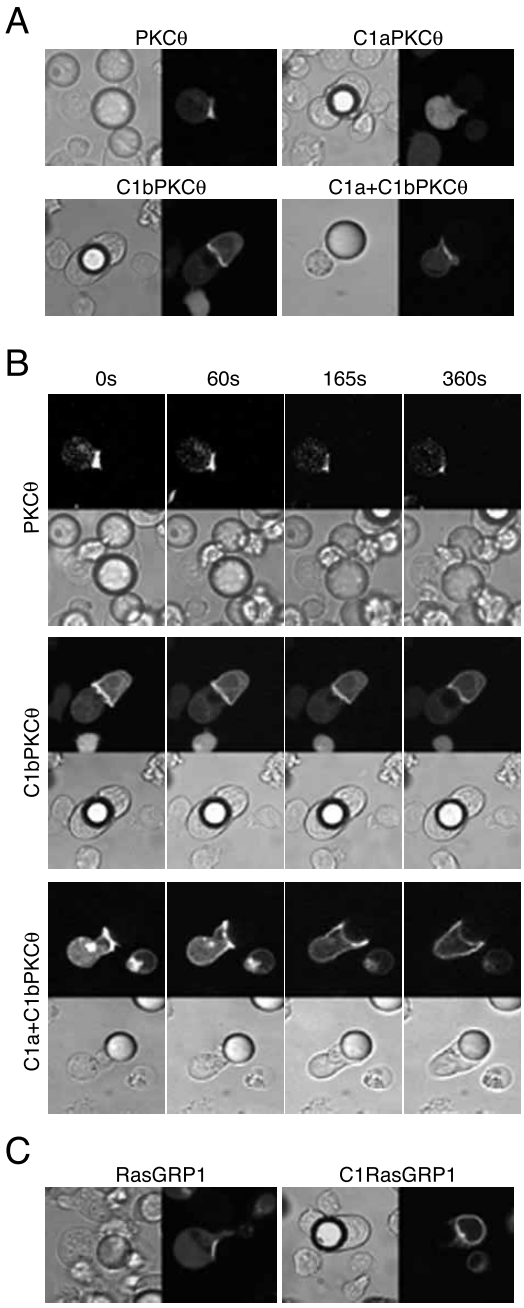


Figure 7. Translocation of full-length RasGRP1, PKCθ, and their C1 domains in response to CD3+CD28 stimulation. Jurkat cells were transfected with (A) GFP-fused PKCθ, C1aPKCθ, C1bPKCθ or C1a+C1bPKCθ or (C) with GFPRasGRP1 or GFPC1RasGRP1 constructs. At 24 h post-transfection, cells were suspended in HBSS and CD3+CD28-coated microspheres were added at a 2:1 cell:bead proportion, mounted as in Figure 1B for confocal microscopy, and representative cells captured for each condition. (B) Images at times indicated are shown to illustrate GFPC1 domain subcellular localization; full time-lapse confocal recording is shown in Supplementary Videos 15–17.

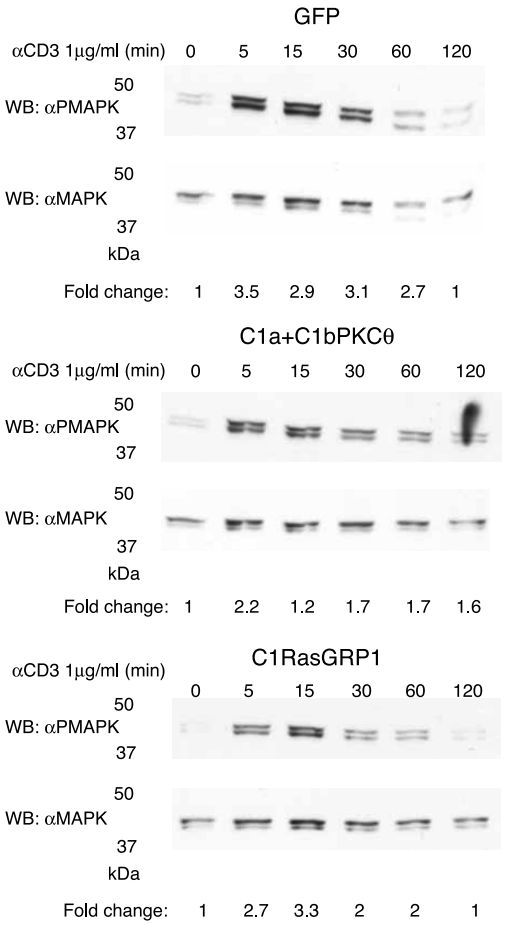


Figure 8. C1RasGRP and C1a+C1bPKCθ modify Ras activation in response to soluble CD3 activation. Cells transfected with GFP, C1RasGRP or C1a+C1bPKCθ were sorted to recover GFP-positive cells. GFP expression was assessed by flow cytometry after 8 h culture; cells were then serum-starved (1 h), stimulated with soluble CD3 (1 μg/ml) for the times indicated, then collected and processed (see MATERIALS AND METHODS) for Western blot. Analysis with PMAPK antibody showed Jurkat cell activation differences according to the construct transfected. Anti-MAPK antibody was used as a protein loading control. Results are representative of four independent experiments. GFP and GFPC1RasGRP cells were 95% GFP-positive; GFPC1a+C1bPKCθ cells were 78% GFP-positive. The *x*-fold change in activation for each condition was estimated by densitometric analysis of filters. Values (arbitrary units) were normalized taking into consideration the protein levels of each sample as determined by Western blot analysis.

membrane. In the presence of Ca^{2+}, conserved domain 2 (C2) direct the protein to the membrane, where phosphatidylserine disrupts C1a:C2 domain contacts. This exposes C1a residues for interaction with DAG, bringing C1b into closer proximity to the plasma membrane (Medkova and Cho, 1999; Bittova *et al.*, 2001). For the novel PKC such as PKCθ, the role of the C1a domain is not well established, although its folding may allow greater PKCθ interaction with the specific lipid environment of the plasma mem-

brane, as reported for other C1 domain combinations (Szallasi *et al.*, 1996; Hunn and Quest, 1997). Accordingly, in vesicle binding experiments, the GFPC1aPKCθ construct interacts with vesicles with no specificity for distinct DAG forms. This domain appears to recognize membranes and may assist the C1bPKCθ in GFPC1a+C1bPKCθ construct to bind vesicles with high affinity, as shown by the percentage of membrane-bound GFPC1a+C1bPKCθ (Figure 4).

Another possibility is C1a domain interaction with membrane proteins, as described for other C1 domains (Oancea *et al.*, 2003). C1b domain affinity for DAG would direct PKCθ to the membrane, which would be stabilized by C1a interaction with plasma membrane protein(s). Further studies should address the exact nature of the role of C1a in membrane interaction. Notwithstanding, the rapid diffusion of C1a+C1bPKCθ over the membrane after anti-CD3+CD28-polarized stimulation suggests that membrane interaction of this domain is lipid driven. It is important to note the difference in membrane localization of C1b or C1a+C1bPKCθ domains compared with that of full-length PKCθ, which remains at the contact zone for a longer period of time. These results concur with previous observations showing that vav-regulated cytoskeletal reorganization participates in PKCθ localization (Villalba *et al.*, 2002).

The combination of confocal microscopy, pharmacological inhibition of the different DAG-generating pathways, and in vitro vesicle binding demonstrates that C1 domains are specific for different DAG species. The C1a+C1bPKCθ domain behaves as a sensor of polyunsaturated DAG in the plasma membrane, whereas RasGRP1 C1 binds strongly to saturated DAG. We nonetheless cannot rule out the influence of other lipids or proteins (Slater *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 2001). For instance, C1β2chimerin did not show high specificity for inner membranes in binding assays, but its interaction with Tmp21-I, an ER protein (Wang and Kazanietz, 2002) may explain the internal localization.

Structural analyses have been used to attempt to explain C1 DAG specificity. Studies of C1bPKCγ indicated that interaction with micelles takes place only in the loops and in the second Zn^{2+} coordination region (Xu *et al.*, 1997). Analysis of membrane-interacting residues to study the cause of distribution variation showed that C1RasGRP1 has a negative charge (glutamic acid) at position five, whereas C1β2chimerin and C1bPKCθ have a valine; this position is involved in stabilizing the residues implicated in second Zn^{2+} coordination (Zhang *et al.*, 1995). As other regions related to membrane binding (Wang *et al.*, 2001) show no clear differences, position five may be important in defining C1 domain specificity and affinity for inner DAG pools. To test this possibility, we generated mutants in position five, replacing glutamic acid with valine in C1RasGRP1, GFPC1RasGRP1(E_V), and valine with glutamic acid in C1bPKCθ, GFPC1bPKCθ(V_E). Localization of the mutated constructs did not differ from the original forms, and they responded equally to PMA stimuli (unpublished data). These residues thus do not appear to be implicated in specificity.

C1RasGRP1 has been modeled using a docking approach (Rong *et al.*, 2002); the resulting structure shows that its binding pocket is shallower than that of C1bPKCδ. This may explain its better recognition of saturated DAG, which is more compact and has less headgroup spacing than polyunsaturated DAG. DOG might insert more easily into the binding pocket than SAG, explaining C1RasGRP1 differential specificity for inner or plasma membrane DAG. Similar observations have been made for the DAG analog specificity of other C1-containing proteins (Wang *et al.*, 2003). Binding groove differences may also explain C1 domain conformational flexibility, which may account for ligand affinity and membrane penetration (Ananthanarayanan *et al.*, 2003)

RasGRP1 translocation to Golgi in response to soluble anti-CD3 and -CD28 was recently described (Bivona *et al.*, 2003), although here we show clear localization to the site in contact with anti-CD3+CD28–coated microspheres. This discrepancy could be due to the activation protocol, because Golgi localization is observed after stimulation with soluble antibodies that induce less sustained responses than that triggered by surface-coupled antibodies (Huppa *et al.*, 2003). Accordingly, in response to anti-CD3–coated plates, RasGRP1 translocates to plasma membrane and accumulates in an internal localization at later times (60 min; Sanjuan *et al.*, 2003). All together, the data suggest that although sustained and polarized signals drive RasGRP1 to the plasma membrane, Golgi localization takes place after transient signaling, or at later times. RasGRP1 localization at the immune synapse would have additional requirements, such as the described vav-dependent cytoskeleton regulation (Caloca *et al.*, 2003b).

The PLCγ-induced SAG increase in the contact zone with anti-CD3+CD28–coated microspheres did not dissociate the C1 domain from its basal internal membrane localization, because C1RasGRP1 has lower affinity for this lipid than for inner membrane DOG. This suggests that RasGRP1 must be in cytosol to be recruited to the plasma membrane. This observation is important, because we find cytoplasmic RasGRP1 only in lymphocytes. When transfected in adherent cells such as COS (Caloca *et al.*, 2003a) or PAE (unpublished data), RasGRP1 is found only in internal structures. This probably renders the protein unable to sense receptor-derived DAG and suggests that RasGRP1 only activates Ras at internal localizations in nonlymphoid cells (Caloca *et al.*, 2003a).

In this study, we characterized various DAG-binding domains that can act at different subcellular sites in T lymphocytes and reached several significant conclusions. First, the C1a+C1bPKCθ domain behaves as a DAG sensor at the plasma membrane, whereas the C1RasGRP1 domain is responsive to DAG mostly at internal localizations. Second, we show that both domains can act not only as lipid sensors, but also perturb the lipid-dependent signal at these sites, altering the kinetics of MAPK phosphorylation in response to T-cell activation. Third, our results showing differential blockade of Ras-dependent signals indicate that RasGRP1 is activated at distinct subcellular sites. Experiments are currently under way to determine the nature of the signals triggered by differential RasGRP1 localization and whether this localization is related to the intensity of the TCR-derived signals. This is of paramount importance, because processes such as positive and negative selection or activation vs. anergy depend on signal intensity (Hogquist, 2001; Appleman and Boussiotis, 2003). The recent description of the deficient mouse phenotype highlighted the complexity role of this protein. Its presence is indispensable for thymocyte development, specifically for positive selection (Dower *et al.*, 2000). Although RasGRP1 is apparently not essential for peripheral T-lymphocyte activation, it is required to maintain their continued proliferation (Priatel *et al.*, 2002).

The combination of C1 domain specificity for different DAG pools, the presence in a protein of one or more C1 domains, and their possible interactions with other proteins indicate the importance of these domains in determining the spatio-temporal localization of the proteins that contain them. The C1 domains characterized here can thus serve as DAG biosensors, specific for distinct DAG pools in the cell.

As we show for plasma membrane, Golgi and ER, they can be used to block stimulation-induced DAG increases at these sites. Finally, characterization of C1RasGRP1 has allowed us to define a possible role for RasGRP1 activation of the Ras pathway in Golgi, opening new directions for study of the activation of this and other members of the small GTPase family in internal cell localizations.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. J.C. Stone and M.G. Kazanietz for RasGRP1 and β2chimerin plasmids, respectively; Dr. M. Renz for antigiantinα antibody; IM group members for stimulating discussion; C. Moreno-Ortiz and A. Moreno for flow cytometry and sorting; S. Gutiérrez and C. Sánchez for confocal and FRAP studies; and C. Mark for excellent editorial assistance. This work was supported in part by Grants BMC2001-1066 from the Spanish Ministry of Science and Technology, 08.3/0022/20002 from Comunidad deMadrid and G03/179 from Instituto deSalud Carlos III. S.C. receives a fellowship from the Spanish Ministry of Education. The Department of Immunology and Oncology was founded and is supported by the Spanish Council for Scientific Research (CSIC) and by Pfizer.

REFERENCES

Ananthanarayanan, B., Stahelin, R.V., Digman, M.A., and Cho, W. (2003). Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are determined by the ligand affinity and conformational flexibility of their C1 domains. J. Biol. Chem. *278*, 46886–46894.

Appleman, L.J., and Boussiotis, V.A. (2003). T cell anergy and costimulation. Immunol. Rev. *192*, 161–180.

Baron, C.L., and Malhotra, V. (2002). Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. Science *295*, 325–328.

Betz, A., Okamoto, M., Benseler, F., and Brose, N. (1997). Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13–1 with the N terminus of syntaxin. J. Biol. Chem. *272*, 2520–2526.

Bi, K., Tanaka, Y., Coudronniere, N., Sugie, K., Hong, S., van Stipdonk, M.J., and Altman, A. (2001). Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation. Nat. Immunol. *2*, 556–563.

Bittova, L., Stahelin, R.V., and Cho, W. (2001). Roles of ionic residues of the C1 domain in protein kinase C-alpha activation and the origin of phosphatidylserine specificity. J. Biol. Chem. *276*, 4218–4226.

Bivona, T.G. *et al.* (2003). Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. Nature *424*, 694–698.

Bivona, T.G., and Philips, M.R. (2003). Ras pathway signaling on endomembranes. Curr. Opin. Cell Biol. *15*, 136–142.

Booden, M.A., Campbell, S.L., and Der, C.J. (2002). Critical but distinct roles for the pleckstrin homology and cysteine-rich domains as positive modulators of Vav2 signaling and transformation. Mol. Cell. Biol. *22*, 2487–2497.

Burns, D.J., and Bell, R.M. (1991). Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. J. Biol. Chem. *266*, 18330–18338.

Caloca, M.J., Zugaza, J.L., and Bustelo, X.R. (2003a). Exchange factors of the RasGRP family mediate Ras activation in the Golgi. J. Biol. Chem. *278*, 33465–33473.

Caloca, M.J., Zugaza, J.L., Matallanas, D., Crespo, P., and Bustelo, X.R. (2003b). Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor Ras GRP1. EMBO J. *22*, 3326–3336.

Clark, G.J., Drugan, J.K., Rossman, K.L., Carpenter, J.W., Rogers-Graham, K., Fu, H., Der, C.J., and Campbell, S.L. (1997). 14–3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. J. Biol. Chem. *272*, 20990–20993.

Coppola, J., Bryant, S., Koda, T., Conway, D., and Barbacid, M. (1991). Mechanism of activation of the vav protooncogene. Cell Growth Differ. *2*, 95–105.

Das, S., Dixon, J.E., and Cho, W. (2003). Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *100*, 7491–7496.

Diaz-Flores, E., Siliceo, M., Martinez, A.C., and Merida, I. (2003). Membrane translocation of protein kinase Ctheta during T lymphocyte activation requires phospholipase C-gamma-generated diacylglycerol. J. Biol. Chem. *278*, 29208–29215.

Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M.D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L., and Hall, A. (1991). Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. Nature *351*, 400–402.

Dower, N.A., Stang, S.L., Bottorff, D.A., Ebinu, J.O., Dickie, P., Ostergaard, H.L., and Stone, J.C. (2000). RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. Nat. Immunol. *1*, 317–321.

Downward, J., Graves, J.D., Warne, P.H., Rayter, S., and Cantrell, D.A. (1990). Stimulation of p21ras upon T-cell activation. Nature *346*, 719–723.

Ebinu, J.O., Bottorff, D.A., Chan, E.Y., Stang, S.L., Dunn, R.J., and Stone, J.C. (1998). RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. Science *280*, 1082–1086.

Ebinu, J.O. *et al.* (2000). RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. Blood *95*, 3199–3203.

Ferrari, D.M., and Soling, H.D. (1999). The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. Biochem. J. *339*(Pt 1), 1–10.

Gerace, L., Blum, A., and Blobel, G. (1978). Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. J. Cell Biol. *79*, 546–566.

Ghosh, S., Xie, W.Q., Quest, A.F., Mabrouk, G.M., Strum, J.C., and Bell, R.M. (1994). The cysteine-rich region of raf-1 kinase contains zinc, translocates to liposomes, and is adjacent to a segment that binds GTP-ras. J. Biol. Chem. *269*, 10000–10007.

Hafizi, S., Alindri, F., Karlsson, R., and Dahlback, B. (2002). Interaction of Axl receptor tyrosine kinase with C1-TEN, a novel C1 domain-containing protein with homology to tensin. Biochem. Biophys. Res. Commun. *299*, 793–800.

Hall, C., Monfries, C., Smith, P., Lim, H.H., Kozma, R., Ahmed, S., Vanniasingham, V., Leung, T., and Lim, L. (1990). Novel human brain cDNA encoding a 34,000 Mr protein n-chimaerin, related to both the regulatory domain of protein kinase C and BCR, the product of the breakpoint cluster region gene. J. Mol. Biol. *211*, 11–16.

Henneberry, A.L., Wright, M.M., and McMaster, C.R. (2002). The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity. Mol. Biol. Cell *13*, 3148–3161.

Ho, C., Slater, S.J., Stagliano, B., and Stubbs, C.D. (2001). The C1 domain of protein kinase C as a lipid bilayer surface sensing module. Biochemistry *40*, 10334–10341.

Hodgkin, M.N., Pettitt, T.R., Martin, A., Michell, R.H., Pemberton, A.J., and Wakelam, M.J. (1998). Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? Trends Biochem. Sci. *23*, 200–204.

Hogquist, K.A. (2001). Signal strength in thymic selection and lineage commitment. Curr. Opin. Immunol. *13*, 225–231.

Hommel, U., Zurini, M., and Luyten, M. (1994). Solution structure of a cysteine rich domain of rat protein kinase C. Nat. Struct. Biol. *1*, 383–387.

Hubbard, S.R., Bishop, W.R., Kirschmeier, P., George, S.J., Cramer, S.P., and Hendrickson, W.A. (1991). Identification and characterization of zinc binding sites in protein kinase C. Science *254*, 1776–1779.

Hunn, M., and Quest, A.F. (1997). Cysteine-rich regions of protein kinase Cdelta are functionally non-equivalent. Differences between cysteine-rich regions of non-calcium-dependent protein kinase Cdelta and calcium-dependent protein kinase Cgamma. FEBS Lett. *400*, 226–232.

Huppa, J.B., Gleimer, M., Sumen, C., and Davis, M.M. (2003). Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. Nat. Immunol. *4*, 749–755.

Hurley, J.H., Newton, A.C., Parker, P.J., Blumberg, P.M., and Nishizuka, Y. (1997). Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. Protein Sci. *6*, 477–480.

Irie, K. *et al.* (2002). Establishment of a binding assay for protein kinase C isozymes using synthetic C1 peptides and development of new medicinal leads with protein kinase C isozyme and C1 domain selectivity. Pharmacol. Ther. *93*, 271–281.

Isakov, N., and Altman, A. (2002). Protein kinase C(theta) in T cell activation. Annu. Rev. Immunol. *20*, 761–794.

Ishizaki, T. *et al.* (1996). The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. EMBO J. *15*, 1885–1893.

Johnson, J.E., Zimmerman, M.L., Daleke, D.L., and Newton, A.C. (1998). Lipid structure and not membrane structure is the major determinant in the regulation of protein kinase C by phosphatidylserine. Biochemistry *37*, 12020–12025.

Jones, D.R., Sanjuan, M.A., Stone, J.C., and Merida, I. (2002). Expression of a catalytically inactive form of diacylglycerol kinase alpha induces sustained signaling through RasGRP. FASEB J. *16*, 595–597.

Kane, L.P., Lin, J., and Weiss, A. (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. Curr. Opin. Immunol. *12*, 242–249.

Kanoh, H., Sakane, F., Imai, S., and Wada, I. (1993). Diacylglycerol kinase and phosphatidic acid phosphatase—enzymes metabolizing lipid second messengers. Cell Signal. *5*, 495–503.

Kazanietz, M.G., Barchi, J.J., Jr., Omichinski, J.G., and Blumberg, P.M. (1995a). Low affinity binding of phorbol esters to protein kinase C and its recombinant cysteine-rich region in the absence of phospholipids. J. Biol. Chem. *270*, 14679–14684.

Kazanietz, M.G., Wang, S., Milne, G.W., Lewin, N.E., Liu, H.L., and Blumberg, P.M. (1995b). Residues in the second cysteine-rich region of protein kinase C delta relevant to phorbol ester binding as revealed by site-directed mutagenesis. J. Biol. Chem. *270*, 21852–21859.

Kurscheid-Reich, D., Throckmorton, D.C., and Rasmussen, H. (1995). Serotonin activates phospholipase D in rat mesangial cells. Am. J. Physiol. *268*, F997–F1003.

Madaule, P., Furuyashiki, T., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Morii, N., and Narumiya, S. (1995). A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. FEBS Lett. *377*, 243–248.

Marshall, M.S. (1995). Ras target proteins in eukaryotic cells. FASEB J. *9*, 1311–1318.

Medkova, M., and Cho, W. (1999). Interplay of C1 and C2 domains of protein kinase C-alpha in its membrane binding and activation. J. Biol. Chem. *274*, 19852–19861.

Monks, C.R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A., and Kupfer, A. (1997). Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. Nature *385*, 83–86.

Oancea, E., Bezzerides, V.J., Greka, A., and Clapham, D.E. (2003). Mechanism of persistent protein kinase D1 translocation and activation. Dev. Cell *4*, 561–574.

Oancea, E., Teruel, M.N., Quest, A.F., and Meyer, T. (1998). Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. J. Cell Biol. *140*, 485–498.

Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1989). Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*, 4868–4871.

Priatel, J.J., Teh, S.J., Dower, N.A., Stone, J.C., and Teh, H.S. (2002). RasGRP1 transduces low-grade TCR signals which are critical for T cell development, homeostasis, and differentiation. Immunity *17*, 617–627.

Quest, A.F., Bardes, E.S., and Bell, R.M. (1994a). A phorbol ester binding domain of protein kinase C gamma. Deletion analysis of the Cys2 domain defines a minimal 43-amino acid peptide. J. Biol. Chem. *269*, 2961–2970.

Quest, A.F., Bardes, E.S., and Bell, R.M. (1994b). A phorbol ester binding domain of protein kinase C gamma. High affinity binding to a glutathione-*S*-transferase/Cys2 fusion protein. J. Biol. Chem. *269*, 2953–2960.

Quest, A.F., and Bell, R.M. (1994). The regulatory region of protein kinase C gamma. Studies of phorbol ester binding to individual and combined functional segments expressed as glutathione *S*-transferase fusion proteins indicate a complex mechanism of regulation by phospholipids, phorbol esters, and divalent cations. J. Biol. Chem. *269*, 20000–20012.

Rebecchi, M.J., and Pentyala, S.N. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. Physiol. Rev. *80*, 1291–1335.

Roberts, R., Sciorra, V.A., and Morris, A.J. (1998). Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. J. Biol. Chem. *273*, 22059–22067.

Rong, S.B. *et al.* (2002). Structural basis of RasGRP binding to high-affinity PKC ligands. J. Med. Chem. *45*, 853–860.

Sanchez-Pinera, P., Micol, V., Corbalan-Garcia, S., and Gomez-Fernandez, J.C. (1999). A comparative study of the activation of protein kinase C alpha by different diacylglycerol isomers. Biochem. J. *337*(Pt 3), 387–395.

Sanjuan, M.A., Jones, D.R., Izquierdo, M., and Merida, I. (2001). Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling. J. Cell Biol. *153*, 207–220.

Sanjuan, M.A., Pradet-Balade, B., Jones, D.R., Martinez, A.C., Stone, J.C., Garcia-Sanz, J.A., and Merida, I. (2003). T cell activation in vivo targets diacylglycerol kinase alpha to the membrane: a novel mechanism for Ras attenuation. J. Immunol. *170*, 2877–2883.

Secrist, J.P., Karnitz, L., and Abraham, R.T. (1991). T-cell antigen receptor ligation induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1. J. Biol. Chem. *266*, 12135–12139.

Seelig, H.P., Schranz, P., Schroter, H., Wiemann, C., Griffiths, G., and Renz, M. (1994). Molecular genetic analyses of a 376-kilodalton Golgi complex membrane protein (giantin). Mol. Cell. Biol. *14*, 2564–2576.

Shindo, M., Irie, K., Nakahara, A., Ohigashi, H., Konishi, H., Kikkawa, U., Fukuda, H., and Wender, P.A. (2001). Toward the identification of selective modulators of protein kinase C (PKC) isozymes: establishment of a binding assay for PKC isozymes using synthetic C1 peptide receptors and identification of the critical residues involved in the phorbol ester binding. Bioorg. Med. Chem. *9*, 2073–2081.

Slater, S.J., Ho, C., Kelly, M.B., Larkin, J.D., Taddeo, F.J., Yeager, M.D., and Stubbs, C.D. (1996). Protein kinase Calpha contains two activator binding sites that bind phorbol esters and diacylglycerols with opposite affinities. J. Biol. Chem. *271*, 4627–4631.

Slater, S.J., Kelly, M.B., Taddeo, F.J., Ho, C., Rubin, E., and Stubbs, C.D. (1994). The modulation of protein kinase C activity by membrane lipid bilayer structure. J. Biol. Chem. *269*, 4866–4871.

Stahelin, R.V., Rafter, J.D., Das, S., and Cho, W. (2003). The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C-alpha and group IVa cytosolic phospholipase A2. J. Biol. Chem. *278*, 12452–12460.

Sun, Z. *et al.* (2000). PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. Nature *404*, 402–407.

Szallasi, Z., Bogi, K., Gohari, S., Biro, T., Acs, P., and Blumberg, P.M. (1996). Non-equivalent roles for the first and second zinc fingers of protein kinase Cdelta. Effect of their mutation on phorbol ester-induced translocation in NIH 3T3 cells. J. Biol. Chem. *271*, 18299–18301.

Thompson, A.K., Mostafapour, S.P., Denlinger, L.C., Bleasdale, J.E., and Fisher, S.K. (1991). The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration and phosphoinositide hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells. A role for Gp in receptor compartmentation. J. Biol. Chem. *266*, 23856–23862.

Valverde, A.M., Sinnett-Smith, J., Van Lint, J., and Rozengurt, E. (1994). Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *91*, 8572–8576.

Villalba, M. et al. (2002). Translocation of P.K.C[theta] in T. cells is mediated by a nonconventional, P.I3-K- and Vav-dependent pathway, but does not absolutely require phospholipase C. J. Cell Biol. *157*, 253–263.

Wang, H., and Kazanietz, M.G. (2002). Chimaerins, novel non-protein kinase C phorbol ester receptors, associate with Tmp21-I (p23): evidence for a novel anchoring mechanism involving the chimaerin C1 domain. J. Biol. Chem. *277*, 4541–4550.

Wang, Q.J., Fang, T.W., Nacro, K., Marquez, V.E., Wang, S., and Blumberg, P.M. (2001). Role of hydrophobic residues in the C1b domain of protein kinase C delta on ligand and phospholipid interactions. J. Biol. Chem. *276*, 19580–19587.

Wang, Q.J., Fang, T.W., Yang, D., Lewin, N.E., Van Lint, J., Marquez, V.E., and Blumberg, P.M. (2003). Ligand structure-activity requirements and phospholipid dependence for the binding of phorbol esters to protein kinase D. Mol. Pharmacol. *64*, 1342–1348.

Whitehead, I., Kirk, H., Tognon, C., Trigo-Gonzalez, G., and Kay, R. (1995). Expression cloning of lfc, a novel oncogene with structural similarities to guanine nucleotide exchange factors and to the regulatory region of protein kinase C. J. Biol. Chem. *270*, 18388–18395.

Williams, J.G., Drugan, J.K., Yi, G.S., Clark, G.J., Der, C.J., and Campbell, S.L. (2000). Elucidation of binding determinants and functional consequences of Ras/Raf-cysteine-rich domain interactions. J. Biol. Chem. *275*, 22172–22179.

Winkler, D.G., Cutler, R.E., Jr., Drugan, J.K., Campbell, S., Morrison, D.K., and Cooper, J.A. (1998). Identification of residues in the cysteine-rich domain of Raf-1 that control Ras binding and Raf-1 activity. J. Biol. Chem. *273*, 21578–21584.

Xu, R.X., Pawelczyk, T., Xia, T.H., and Brown, S.C. (1997). NMR structure of a protein kinase C-gamma phorbol-binding domain and study of protein-lipid micelle interactions. Biochemistry *36*, 10709–10717.

Zhang, G., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M., and Hurley, J.H. (1995). Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. Cell *81*, 917–924.

Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., and Daum, G. (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. *173*, 2026–2034.

β2-chimaerin provides a diacylglycerol-dependent mechanism for regulation of adhesion and chemotaxis of T cells

María Siliceo[1], David García-Bernal[2], Silvia Carrasco[1], Ernesto Díaz-Flores[1], Federico C. Leskow[3], Joaquín Teixidó[2], Marcelo G. Kazanietz[3] and Isabel Mérida[1,*]

[1]Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain
[2]Department of Immunology, Centro de Investigaciones Biológicas/CSIC, Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain
[3]Department of Molecular Pharmacology, University of Pennsylvania Medical School, 3620 Hamilton Walk, Philadelphia, PA 19104, USA
*Author for correspondence (e-mail: imerida@cnb.uam.es)

Accepted 3 October 2005
Journal of Cell Science 119, 000-000 Published by The Company of Biologists 2006

Summary

The small GTPase Rac contributes to regulation of cytoskeletal rearrangement during chemokine-induced lymphocyte adhesion and migration in a multi-step process that is very precisely coordinated. Chimaerins are Rac1-specific GTPase-activating proteins of unknown biological function, which have a canonical diacylglycerol C1-binding domain. Here we demonstrate endogenous expression of β2-chimaerin in T lymphocytes and study the functional role of this protein in phorbol ester and chemokine (CXCL12)-regulated T-cell responses. We used green fluorescent protein-tagged β2-chimaerin and phorbol ester stimulation to investigate changes in protein localization in living lymphocytes. Our results demonstrate that active Rac cooperates with C1-dependent phorbol ester binding to induce sustained GFP-β2-chimaerin localization to the membrane. Subcellular distribution of GFP β2-chimaerin in living cells showed no major changes following CXCL12 stimulation. Nonetheless Rac1-GTP levels were severely inhibited in GFP-β2-chimaerin-expressing cells, which displayed reduced CXCL12-induced integrin-dependent adhesion and spreading. This effect was dependent on chimaerin GTPase-activating protein function and required diacylglycerol generation. Whereas β2-chimaerin overexpression decreased static adhesion, it enhanced CXCL12-dependent migration via receptor-dependent diacylglycerol production. These studies demonstrate that β2-chimaerin provides a novel, diacylglycerol-dependent mechanism for Rac regulation in T cells and suggest a functional role for this protein in Rac-mediated cytoskeletal remodeling.

Supplementary material available online at
http://jcs.biologists.org/cgi/content/full/119/??/????/DC1

Key words: Diacylglycerol, C1 domain, Chemokines, Immune response, Rac GTPases

Introduction

The chemokines are a family of low-molecular-weight chemotactic proteins that can induce directional migration of cells. CXCL12 (stromal-cell-derived factor 1α; SDF-1α) is a CXC chemokine initially identified as a growth-stimulating factor for B-cell progenitors (Nagasawa et al., 1994). It is expressed in a broad range of tissues and has numerous biological activities in diverse cell types including T lymphocytes, monocytes, pre-B lymphocytes and dendritic cells (Kucia et al., 2004). CXCL12-induced chemotactic activity is mediated by the seven-transmembrane G protein-coupled receptor (GPCR) CXCR4, also a known co-receptor for T-cell-tropic human immunodeficiency virus strains (Bleul et al., 1996; Oberlin et al., 1996). CXCR4 is the only chemokine receptor with ubiquitous expression in precursor and mature leukocytes, suggesting a general function in leukocyte homeostasis. During lymphocyte transendothelial migration, CXCL12 binding to its receptor results in rapid activation of T-cell integrins, including α4β1 (Grabovsky et al., 2000). Interaction of integrins with their vascular ligands leads to arrest and firm adhesion of the circulating lymphocytes, and subsequent transmigration through the endothelium. Targeted disruption of *Cxcl12* or *Cxcr4* in mice showed their crucial functions for fetal development of the hematopoietic, cardiovascular and cerebellar systems (Nagasawa et al., 1996; Nagasawa et al., 1998).

As is the case for other chemokines, CXCL12 signals through heptahelical GPCR known to activate phospholipase C (PLC), which induce Ca^{2+} mobilization from intracellular stores and increase membrane diacylglycerol (DAG) levels. This lipid messenger, as well as its related analogs the phorbol esters (PE), exerts its actions through binding to specific C1 domains, first described in the classical and novel protein kinase C family (Kazanietz, 2002). DAG/PE-dependent binding leads to membrane translocation/activation of the C1-containing target proteins (Brose et al., 2004; Hurley and Meyer, 2001). The role of PLC-dependent DAG generation in the regulation of chemotaxis is debated. PLCβ2 and β3 are proposed to exert a negative role in leukocyte migration (Li et al., 2000), whereas other reports suggest that chemokine-dependent PLC activation is necessary for T-cell chemotaxis (Smit et al., 2003; Spiegel et al., 2004). In any case, the identity

of the downstream signal targets of DAG generation and their exact role in the regulation of chemokine-dependent responses remains to be determined.

Directional migration requires coordinated regulation of signaling crosstalk between chemoattractant receptors and the cytoskeleton, in a process precisely regulated by the small GTP-binding proteins Rho, Rac and Cdc42. The activity of these proteins depends on the cellular ratio of inactive (GDP-bound) and active (GTP-bound) forms regulated by guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase-activating proteins (GAPs). The GEFs act as positive regulators, catalyzing GDP exchange for GTP, whereas the GAPs accelerate GTP hydrolysis to GDP, catalyzing inactivation of Rho family protein (Takai et al., 2001).

Chimaerins are Rac1-specific GAPs of unknown biological function, characterized by the presence of a high-affinity DAG-binding C1 domain (Diekmann et al., 1991; Hall et al., 1990). The chimaerin family is composed of two isoforms, α and β, encoded by two different genes, with two alternative splice variants each (1 and 2). All chimaerins have a Rac-GAP domain together with a C1 module; in addition, type 2 isoforms exhibit an extended N-terminal region encompassing an SH2-type domain (Hall et al., 1993). Chimaerins are expressed abundantly in brain, where developmentally regulated expression has been shown for α and β2 isoforms (Hall et al., 2001; Lim et al., 1992). β1-chimaerin, expressed specifically in testis, is also developmentally regulated during acrosomal assembly (Leung et al., 1993). β2-chimaerin was first identified as a 46 kDa protein in rat cerebellum (Leung et al., 1994). When overexpressed in COS cells, β2-chimaerin relocates to the plasma and Golgi membranes in response to PE and other DAG analogs (Kazanietz, 2002). PE-dependent β2-chimaerin translocation requires the C1 domain (Caloca et al., 1999), and is mediated by PE binding as well as by direct interaction with Tmp21, a Golgi transmembrane protein (Wang and Kazanietz, 2002).

In this study we demonstrate endogenous expression of β2-chimaerin in T lymphocytes and investigate its role in the modulation of CXCL12-dependent functions. Integrin-dependent adhesion, actin polymerization, and cell spreading can be induced by CXCL12, and are essential for CXCL12-induced polarized T-cell migration. We demonstrate that overexpression of green fluorescent protein (GFP)-β2-chimaerin alters all three parameters, showing a functional role for this protein in CXCL12-regulated responses. β2-chimaerin function requires its Rac-GAP activity and a functional C1 domain. While exerting a negative role on chemokine-induced static adhesion, β2-chimaerin potentiates the chemotactic response to CXCL12 in a DAG-dependent fashion. This study provides new evidence for the role of non-kinase DAG receptors in the regulation of T-cell responses, and suggests a functional role for β2-chimaerin in the regulation of CXCL12-dependent responses.

Results

Jurkat T cells express endogenous chimaerin

We assessed β2-chimaerin expression in the Jurkat acute T-cell leukemia-derived cell line by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), using specific primers and plasmids encoding different chimaerin isoforms as controls (Fig. 1A). Expression of endogenous protein was confirmed in these cells,

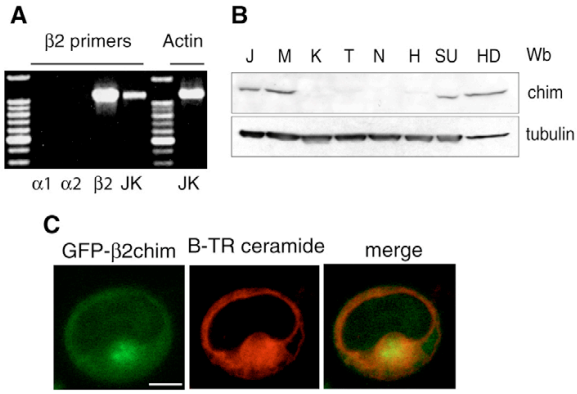


Fig. 1. β2-chimaerin is expressed in lymphoid cells. (A) Expression of β2-chimaerin mRNA was determined in Jurkat T cells (JK) by RT-PCR using specific oligonucleotides; α1, α2 and β2-expressing plasmids were used as controls. (B) β2-chimaerin protein expression was analyzed in total lysates of the indicated lymphoid cell lines by western blotting with anti-β2-chimaerin antibody. Membranes were re-probed with anti-tubulin antibody as a protein loading control. H, HT; HD, HDLM2; J, Jurkat; K, Karpas; M, Molt-4; N, Namalwa; SU, SU-DHL1; T, Toledo. (C) Subcellular localization of GFP-β2-chimaerin in Jurkat T cells was examined by confocal microscopy (green, left), the Golgi was stained with the BODIPY TR fluorescent marker ceramide (red, center); merged fluorescence is shown in the right panel. Bar, 3 μm.

as well as in different human leukemia and lymphoma cell lines, using an antibody to the β2-chimaerin catalytic domain. Western blot analysis of cell lysates showed expression of a protein of appropriate molecular mass (Fig. 1B). High protein expression was observed in Jurkat and in Molt-4 acute lymphoblastic leukemia cells, as well as in cell lines derived from anaplastic large cell and Hodgkin's lymphomas. No protein expression was detected in lymphoma cell lines of other origins.

To study β2-chimaerin function in T lymphocytes, we generated a GFP-tagged protein and examined its intracellular distribution. Western blot analysis indicated that GFP-β2-chimaerin was expressed and migrated according to the predicted molecular size of the fusion protein (not shown). Confocal images showed that GFP-β2-chimaerin localized in cytosol, and fluorescent staining indicated partial co-localization of GFP-β2-chimaerin with the Golgi apparatus (Fig. 1C).

PMA-dependent regulation of GFP-β2-chimaerin in Jurkat cells

β2-chimaerin has a canonical C1-type domain, suggestive of DAG/PE-dependent regulation. To analyze its functional role, we examined the intracellular distribution of GFP-tagged β2-chimaerin in response to the PE phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), and compared it with that of the isolated β2-chimaerin C1 domain. Confocal analysis of living Jurkat T cells showed that the GFP-β2-chimaerin C1 domain (GFP-C1), which showed a diffuse localization in untreated cells, was rapidly relocated to membranes following PMA addition (Fig.

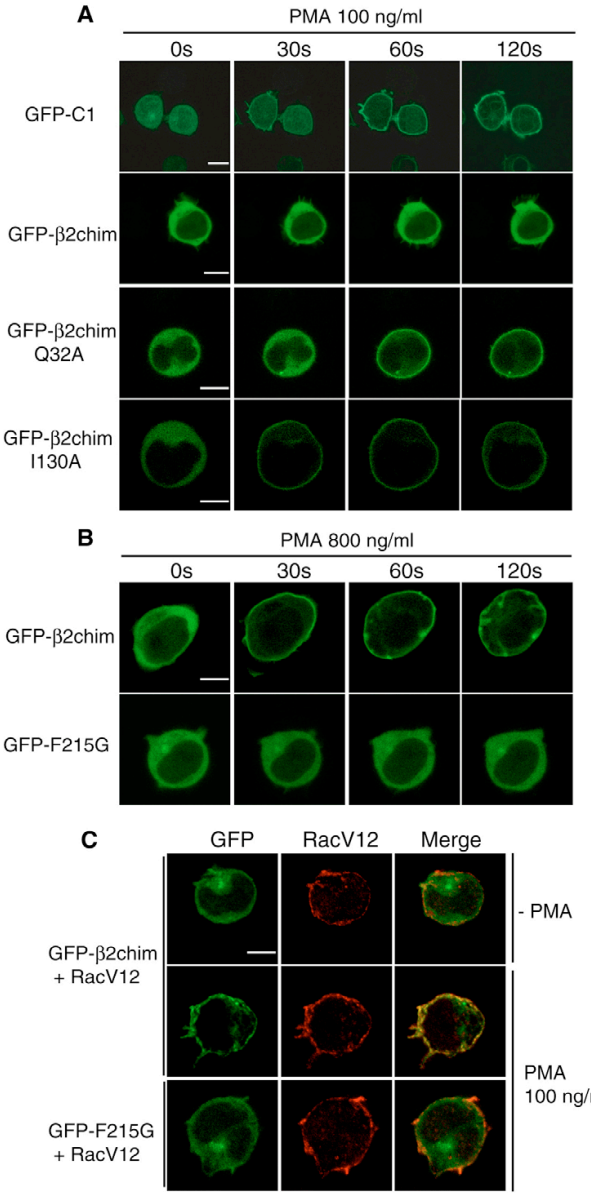


Fig. 2. PMA-dependent regulation of GFP-β2-chimaerin in intact Jurkat cells. (A) Jurkat T cells were transfected with vectors encoding GFP-β2-chimaerin C1 domain (GFP-C1), GFP-β2-chimaerin, GFP-β2-chimaerin Q32A and GFP-β2-chimaerin I130A. At 24 hours post-transfection, cells were suspended in HBSS and plated on poly-D,L-lysine-coated chamber slides. Slides were mounted on a 37°C plate and analyzed by confocal microscopy. PMA was added at 100 ng/ml after the first frame, and images captured every 10 seconds. Time-lapse confocal recording is shown in Movie 1 in the supplementary material. Images are shown at the indicated times to illustrate subcellular protein localization. (B) Jurkat T cells were transfected with GFP-β2-chimaerin or GFP-β2-chimaerin C1 domain mutant (GFP-F215G). At 24 hours post-transfection, cells were treated as in A. PMA (800 ng/ml) was added after the first frame, and images captured every 10 seconds. Time-lapse confocal recording is shown in Movie 2 in supplementary material. Images are shown at the indicated times to illustrate subcellular protein localization. (C) Jurkat T cells were co-transfected with a EE-tagged, constitutive active (RacV12) Rac mutant and either GFP-β2-chimaerin or GFP-F215G mutant. At 24 hours post-transfection, cells were stimulated with PMA (100 ng/ml) for 3 minutes, fixed, stained with anti-EE antibodies (red) and images acquired by confocal microscopy. GFP-β2-chimaerin localization (green) is shown in the left column, RacV12 expression (red) is shown in the middle column, merge images are shown on the right. Time-lapse confocal recording of a similar experiment performed in living cells is shown in Movie 3 in supplementary material. Bars, 5 μm.

2A and Movie 1 in supplementary material). In these cells, addition of the same PMA concentration nonetheless did not induce translocation of the full-length β2-chimaerin. The recently reported crystal structure of β2-chimaerin (Canagarajah et al., 2004) suggests a conformation for the native protein in which the C1 domain is hidden and not readily available for DAG/PMA binding. We examined PMA-dependent translocation of two GFP-β2-chimaerin constructs bearing mutations of glutamine in position 32 or isoleucine in position 130, two residues suggested to maintain a closed protein conformation through intramolecular interactions (Canagarajah et al., 2004). PMA-dependent translocation of GFP-β2-chimaerin Q32A or I130A mutants fully mimicked that of the isolated C1 domain (Fig. 2A and Movie 1 in supplementary material). These results further confirm that the lack of PMA-dependent GFP-β2-chimaerin translocation correlates with a buried C1 domain in the native protein conformation.

As described for COS cells (Caloca et al., 2001), at higher PMA concentration β2-chimaerin relocated rapidly to both internal and plasma membrane sites (Fig. 2B and Movie 2 in supplementary material). To assess the contribution of the C1 domain to PMA-dependent translocation, we generated a GFP-β2-chimaerin construct in which the conserved phenylalanine in C1 domain position 3 was mutated to glycine (F215G). Studies with PKCδ showed that this residue is crucial for PMA binding when the ligand is presented in micelles, as indicated by the lack of binding in point mutants at this position (Kazanietz et al., 1995). The F215G mutation fully impaired PMA-dependent translocation of the mutant, confirming that C1-mediated binding to PMA is essential for membrane translocation in living cells (Fig. 2B and Movie 2 in supplementary material). Lack of PMA-dependent GFP-β2-chimaerin F215G translocation mirrored the behavior of a C246A mutant, shown to prevent DAG/PMA binding to β2-chimaerin (Caloca et al., 2001).

At high PMA doses, the cells displayed lamellipodium-like extensions, a phenotype suggestive of Rac activation (Ridley et al., 1992). We considered that Rac-GTP levels might determine the extent of GFP-β2-chimaerin membrane translocation. We thus analyzed PMA-dependent GFP-β2-chimaerin translocation in cells expressing a constitutive active Rac mutant (RacV12). In the absence of additional stimulation, GFP-β2-chimaerin localization did not change in RacV12-

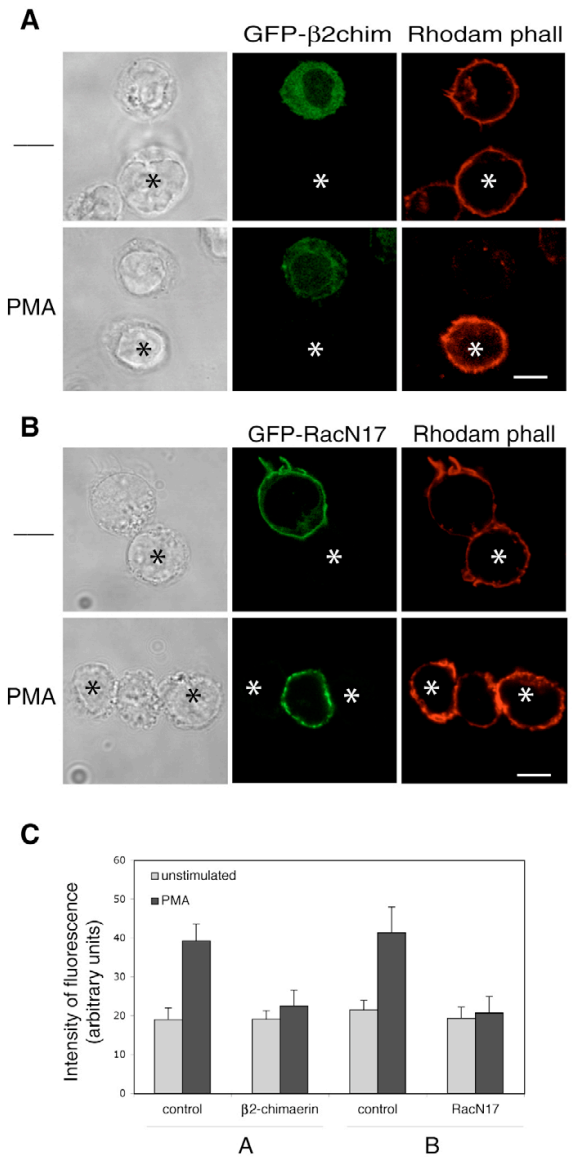


Fig. 3. GFP-β2-chimaerin-expressing Jurkat T cells show reduced PMA-induced F-actin polymerization. Jurkat T cells transfected with (A) GFP-β2-chimaerin or (B) a GFP-coupled dominant-negative (RacN17) Rac mutant were stimulated with PMA (800 ng/ml, 5 minutes) or unstimulated (–), fixed and processed to determine GFP-β2-chimaerin (A) or GFP-RacN17 (B) localization (green) and actin polymerization by Rhodamine-phalloidin staining (red). Control cells not expressing GFP constructs are indicated with an asterisk. Phase-contrast micrographs show the cells analyzed (left). Images are representative of the field observed for each condition. (C) Quantification of F-actin polymerization of experiments described in A and B was determined by analyzing intensity of fluorescence of Rhodamine-phalloidin staining. Values are the mean ± s.d. fluorescence intensity (arbitrary units) corresponding to 20 cells for each condition. Bars, 5 μm.

expressing cells, indicating that high levels of active Rac are not sufficient to induce membrane translocation (Fig. 2C, upper panel). Nonetheless, in RacV12-expressing cells, GFP-β2-chimaerin relocated to the plasma membrane in response to the same, lower PMA dose that triggered relocation of the isolated C1 domain (Fig. 2C, middle panel and Movie 3 in supplementary material). In RacV12-expressing cells, PMA-dependent translocation was not observed for the GFP-β2-chimaerin F215G mutant, confirming the essential role of the C1 domain for membrane translocation in living cells (Fig. 2C, lower panel and Movie 3 in supplementary material). All together, these results suggest that levels of active Rac cooperate with C1-dependent PMA binding to induce sustained GFP-β2-chimaerin localization to the membrane.

GFP-β2-chimaerin downmodulates PMA-induced actin polymerization

Rac-dependent regulation of actin polymerization is crucial for many different T-lymphocyte functions, including cell adhesion and migration. To determine whether PMA-dependent translocation of β2-chimaerin modulated Rac-dependent functions in Jurkat cells, we next examined F-actin polymerization after PMA stimulation. Cell staining with the fluorescent marker Rhodamine-phalloidin showed similar basal F-actin polymerization both in control (GFP-negative) and GFP-β2-chimaerin expressing (GFP-positive) cells (Fig. 3A, upper panel). Following PMA addition, the increase on F-actin staining observed in control (GFP-negative) cells, was severely impaired in GFP-β2-chimaerin expressing cells (Fig. 3A, lower panel). The impairment in PMA-induced F-actin polymerization observed in β2-chimaerin-expressing cells was reproduced in cells expressing a Rac-inactivating mutant (RacN17) fused to GFP (Fig. 3B). Quantification of the experiments described above is shown in Fig. 3C. This confirms the Rac-GAP function of β2-chimaerin and demonstrates its functional role in PMA-dependent cytoskeletal remodeling.

GFP-β2-chimaerin inhibits CXCL12-induced cell spreading

Cell spreading is a flattening of the cell that increases the surface area of the contact region with the extracellular matrix, to allow stronger adhesion. Integrin-dependent spreading is observed following addition of CXCL12, a potent regulator of cytoskeletal remodeling which, through binding to a GPCR, induces PLCβ-mediated DAG generation. To get further insight into the functional relevance of β2-chimaerin activity, we next examined β2-chimaerin-dependent regulation of integrin α4β1-dependent spreading onto vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in response to CXCL12. Addition of CXCL12 to control GFP-expressing cells induced characteristic spreading, with rapid lamellipodia-like extension, indicative of Rac activation (Fig. 4 and Movie 4 in supplementary material). Cell spreading was abolished in cells co-expressing GFP and the dominant-negative Rac mutant RacN17 (not shown) confirming previous data showing that Rac regulates integrin-mediated T-lymphocyte spreading and adhesion (D'Souza-Schorey et al., 1998). When analyzed, most GFP-β2-chimaerin-expressing cells remained rounded after CXCL12 addition, and only a few cell projections were observed (Fig. 4 and Movie 4 in supplementary material).

Spreading was observed in cells co-transfected with GFP-β2-chimaerin and RacV12, indicating that the effect of this DAG receptor is due to modification of CXCL12-dependent Rac activation (Fig. 4).

Videomicroscopy analysis allowed us to examine not only the functional effect on cells expressing GFP-β2-chimaerin, but also the changes in the subcellular localization of ectopically expressed protein in response to CXCL12-addition. As was the case for addition of lower PMA doses (see Fig. 2A), we observed no major relocalization of the protein in living cells, and found CXCL12-induced subcellular β2-chimaerin relocalization only when cells were fixed (not shown). This suggests that modulation of a minor GFP-β2-chimaerin fraction, not readily detected in living cells, was sufficient to attenuate CXCL12-induced cell spreading.

GFP-β2-chimaerin downmodulates CXCL12-induced Rac activation and inhibits CXCL12-induced cell adhesion to VCAM

Previous studies in COS cells have suggested that the GTPase-activating function of β2-chimaerin in COS cells is Rac-specific, and is not seen for Cdc42 or RhoA (Caloca et al., 2003). We next examined CXCL12-and PMA-mediated Rac activation in β2-chimaerin-expressing Jurkat T lymphocytes adhered to fibronectin, using a pull-down assay with the GST-fused Rac-binding domain of PAK-1. In parental Jurkat cells, basal Rac-GTP levels increased after CXCL12 addition, and further activation was observed after PMA stimulation (Fig. 5A). GFP-β2-chimaerin expression greatly reduced basal Rac-GTP levels. Compared to control cells, CXCL12-induced considerably lower Rac-GTP levels, whereas PMA-induced Rac activation was completely absent in GFP-β2-chimaerin-expressing cells (Fig. 5A). These results demonstrate the Rac-GAP function of GFP-β2-chimaerin in Jurkat T cells, and suggest that CXCL12/PMA stimulation regulates chimaerin-dependent Rac modulation.

The α4β1 integrin has an important role in T-cell migration to peripheral lymph nodes and infected tissue, mediating the capture and subsequent firm adhesion of the migrating lymphocytes to the vascular wall. We next examined β2-chimaerin-dependent regulation of integrin α4β1-dependent adhesion to VCAM-1. We observed no apparent differences between basal integrin α4-dependent adhesion in cells

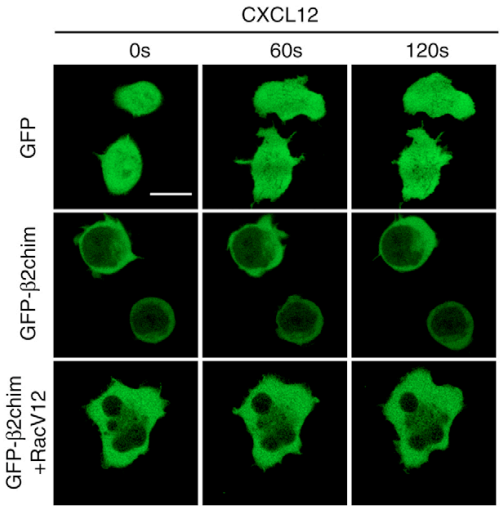


Fig. 4. GFP-β2-chimaerin-expressing Jurkat T cells show reduced CXCL12-dependent cell spreading to immobilized VCAM-1. Jurkat T cells were transiently transfected with vectors encoding GFP, GFP-β2-chimaerin or GFP-β2-chimaerin plus RacV12. After 24 hours, cells were suspended in HBSS and plated onto VCAM-1-coated slides. Slides were mounted on a 37°C plate and analyzed by confocal microscopy. CXCL12 (200 ng/ml) was added after the first frame and images captured every 10 seconds. Time-lapse confocal recording is shown in Movie 4 in supplementary material. Images are shown at the indicated times to illustrate cell spreading. Bar, 10 μm.

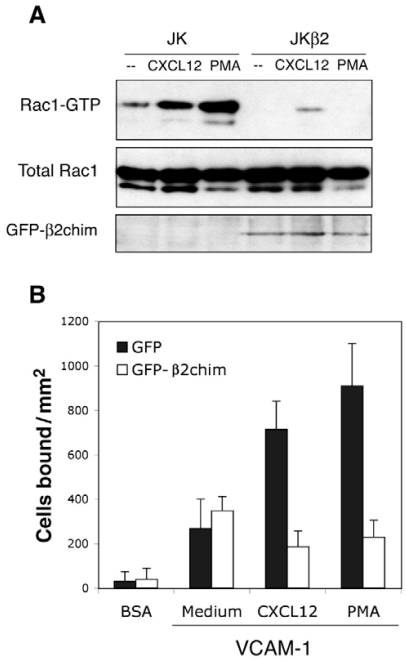


Fig. 5. GFP-β2-chimaerin-expressing Jurkat T cells show reduced CXCL12/PMA-induced Rac activation and adhesion to immobilized VCAM-1. (A) Control Jurkat cells (JK) or Jurkat cells stably transfected with GFP-β2-chimaerin (JKβ2) were plated onto fibronectin and stimulated with CXCL12 (200 ng/ml, 60 minutes) or PMA (100 ng/ml, 30 minutes). Cells were lysed and Rac-GTP determined by pull-down assays with PAK-RBD-GST (see Materials and Methods). Samples were separated by SDS-PAGE and Rac-GTP levels determined by western blotting with anti-Rac antibody. One-tenth of each sample was analyzed for total Rac level and β2-chimaerin expression. (B) Jurkat cells were transfected with GFP or GFP-β2-chimaerin-expressing vectors; GFP-positive cells were sorted after 24 hours. Sorted cells were added to wells coated with BSA or sVCAM-1, either alone (medium) or co-immobilized with CXCL12. Where indicated, cells were stimulated with PMA (100 ng/ml, 5 minutes) before addition to sVCAM-1-coated wells. Cells were allowed to adhere at 37°C for 2 minutes. Unbound cells were washed and the extent of adhesion determined as described (see Materials and Methods). Data represent the mean ± s.d. of at least three independent experiments performed in triplicate.

expressing GFP-β2-chimaerin or control GFP. As reported for Jurkat cells (Feigelson et al., 2001), CXCL12 markedly increased adhesion of control GFP-expressing cells to VCAM-1, whereas the HP1/2 anti-α4 antibody completely blocked the adhesion (not shown). β2-chimaerin expression abolished any CXCL12-stimulated adhesion to VCAM (Fig. 5B). This was also the case for PMA-induced cell adhesion, which suggests an important role for DAG/PMA-dependent β2-chimaerin regulation in integrin-induced adhesion.

Expression of a GFP-β2-chimaerin lacking GAP activity does not prevent CXCL12- and PMA-mediated adhesion to VCAM

To assess the precise role of the β2-chimaerin GAP activity in CXCL12- and PMA-induced cell adhesion, we studied the effect of a mutant with a deletion in the conserved GAP domain EIE sequence. A similar deletion in α-chimaerin prevents GAP activity while maintaining Rac binding (Ahmed et al., 1994). Measure of endogenous Rac-GTP levels by a pull-down assay showed that the EIE deletion in the β2-chimaerin GAP domain resulted in higher Rac-GTP levels in cells expressing this mutant (Fig. 6A). Basal adhesion to VCAM-1 of cells expressing the mutant was higher than in GFP- and GFP-β2-chimaerin-expressing cells (Fig. 6B). When we measured CXCL12- and PMA-dependent adhesion, cells expressing the GAP-inactive β2-chimaerin again showed increased adhesion compared to that observed in GFP-β2-chimaerin-expressing cells (Fig. 6B). This confirms the role of β2-chimaerin GAP activity in the regulation of α4β1-dependent cell adhesion.

GFP-β2-chimaerin expression in primary T cells decreases CXCL12- and PMA-mediated adhesion to VCAM

We next evaluated the functional effect of β2-chimaerin and the GAP-inactive mutant in primary human peripheral blood T lymphocytes (PBLs). Primary PBLs expressed endogenous chimaerin, although expression was lower than that observed in Jurkat T cells (Fig. 7, inset). As for Jurkat cells, GFP-β2-chimaerin expression in primary T cells severely impaired CXCL12-induced adhesion to VCAM-1 (Fig. 7), confirming a role for β2-chimaerin as a negative modulator of chemokine-induced integrin-dependent adhesion. Again, and as described above for Jurkat cells, the GAP-inactive mutant did not affect chemokine-regulated adhesion. Prevention of adhesion by the wild-type protein and lack of effect of the GAP mutant were also observed following PMA stimulation, suggesting that regulation of the CXCL12-dependent effect is mediated by DAG generation.

Role of the C1 domain in CXCL12/PMA-dependent regulation of β2-chimaerin

The previous results demonstrated that, via its Rac-GAP activity, GFP-β2-chimaerin acts as a potent attenuator of CXCL12-induced cell spreading and adhesion. Videomicroscopy analysis of GFP-β2-chimaerin and the mutants (see Fig. 2A) suggest that, as indicated by structural

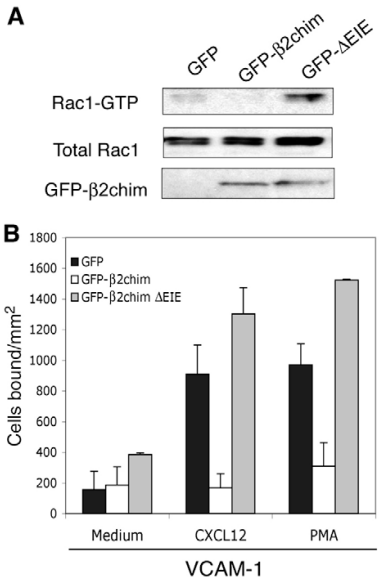


Fig. 6. Effect of a GFP-β2-chimaerin GAP-defective mutant on CXCL12/PMA-induced adhesion. (A) Vectors encoding GFP, GFP-β2-chimaerin or a β2-chimaerin GAP-defective mutant bearing a deletion of the EIE sequence (GFP-ΔEIE) were transfected into HEK293 cells. At 24 hours post-transfection, cells were lysed and Rac-GTP levels determined by pull-down assays with PAK-RBD-GST. One-tenth of each sample was analyzed for total Rac level and β2-chimaerin expression. (B) Jurkat T cells were transfected with the indicated plasmids; cells were sorted 24 hours post-transfection and GFP-positive cells tested for adhesion as in Fig. 5. Data represent the mean ± s.d. of at least three independent experiments performed in triplicate.

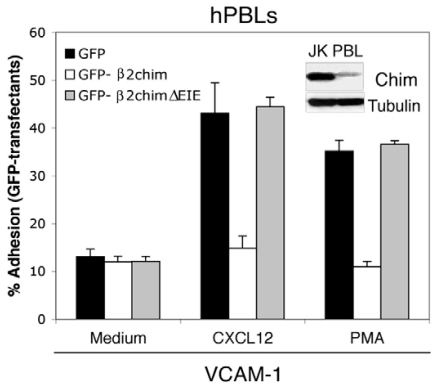


Fig. 7. Effect of GFP-β2-chimaerin on CXCL12/PMA-induced adhesion of primary blood T lymphocytes. Human peripheral blood mononuclear cells were prepared, and T lymphocytes were isolated and nucleofected as described in the materials and Methods. After 6 hours, cells were added to wells coated with sVCAM-1 alone (medium), or co-immobilized with CXCL12 and allowed to adhere (37°C, 2 minutes). Where indicated, cells were stimulated with PMA (100 ng/ml, 5 minutes) before addition to the wells. The inset shows endogenous β2-chimaerin expression in cell lysates of Jurkat and hPBLs, determined by western blotting. Tubulin expression was measured as a control of total protein levels. Data represent the mean ± s.d. of two independent experiments performed in triplicate.

studies (Canagarajah et al., 2004), the β2-chimaerin C1 domain is not exposed in the native conformation. This renders a protein that requires a considerable conformational change to bind DAG raising a question about the functional relevance of this particular domain on CXCL-12-regulated cell adhesion and spreading.

Hence we next examined the specific contribution of this C1 domain to the functional effects of β2-chimaerin in CXCL12-dependent responses using the previously described GFP-β2-chimaerin F215G mutant. When analyzed, mutation of the C1 domain prevented the effect of wild-type β2-chimaerin on PMA-induced integrin-dependent adhesion (Fig. 8A). We next examined CXCL12-mediated spreading and adhesion of Jurkat cells expressing the GFP-β2-chimaerin F215G mutant. Videomicroscopy of cells adhered to VCAM-1 showed normal CXCL12-induced cell spreading in cells expressing the mutant (Fig. 8B, Fig. 4 and Movie 4 in supplementary material). Finally, C1 mutation completely abrogated the inhibitory effect of wild-type β2-chimaerin on integrin-dependent adhesion following CXCL12 stimulation (Fig. 8C). The results demonstrate that DAG binding to the β2-chimaerin C1 domain is an absolute requirement for β2-chimaerin function.

Jurkat T cells stably transfected with GFP-β2-chimaerin show enhanced CXCL12-dependent chemotaxis

CXCL12 is a potent chemotactic agent for T lymphocytes. To study the role of β2-chimaerin in chemokine-regulated cell migration, we generated stable Jurkat cell transfectants expressing GFP-β2-chimaerin or GFP as controls, and analyzed CXCL12-induced chemotaxis in a Transwell assay. GFP-β2-chimaerin levels were readily detected in Western blot using anti-chimaerin antibodies, and CXCR4 expression levels were comparable in transfected and parental cell lines, as measured by flow cytometry (not shown). As in transiently transfected cells, CXCL12-induced cell adhesion to VCAM was severely impaired (not shown). When CXCL12-induced chemotaxis was examined at different times, GFP-β2-chimaerin expressing cells showed increased migration compared to parental Jurkat cells (Fig. 9A). A CXCL12 dose-response curve showed enhanced migration of GFP-β2-chimaerin cells compared with parental cells from the lowest CXCL12 concentrations tested (Fig. 9B).

To determine the nature of the CXCL12-regulated signals responsible for enhanced migration of β2-chimaerin-expressing cells, we tested the effect of pharmacological inhibition on chemokine-dependent migration. CXCR4 activity is induced mainly through $G\alpha_i$; accordingly, CXCL12-dependent Jurkat T-cell migration was prevented by pertussis toxin (PTx) treatment of the cells (Fig. 9C). CXCL12-induced migration of GFP-β2-chimaerin-expressing cells was also prevented by PTx treatment, suggesting $G\alpha_i$-dependent modulation of β2-chimaerin-regulated cell functions. To further assess the role of CXCL12-mediated PLC activation in the β2-chimaerin effect, we examined the migratory capacity of cells treated with the PLC inhibitor U73122. Inhibitor treatment reverted enhanced chemotaxis in CXCL12-stimulated β2-chimaerin-expressing cells at doses (1 μM) that produced no effect on cell migration in parental or GFP-expressing cells (Fig. 9C). A higher U73122 dose (5 μM) completely inhibited migration in all three cell lines (not shown), suggesting that β2-chimaerin-expressing cells were

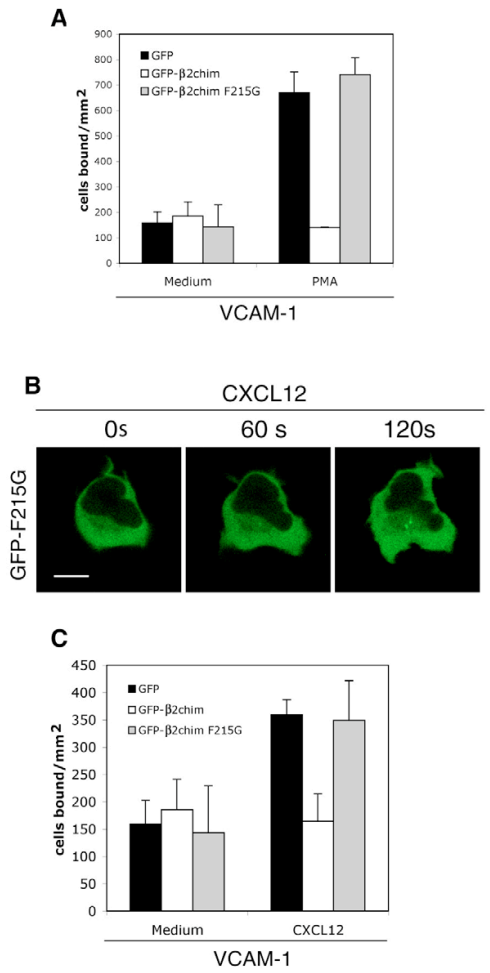


Fig. 8. CXCL12- and PMA-dependent regulation of β2-chimaerin requires a functional C1 domain. (A) Jurkat T cells were transfected with a GFP-β2-chimaerin C1 domain mutant (GFP-F215G). At 24 hours post-transfection, cells were sorted and GFP-positive cells tested for PMA-induced adhesion to sVCAM-1 as in Fig. 5. Data represent the mean ± s.d. of two independent experiments performed in triplicate. (B) Jurkat cells were transfected with GFP-β2-chimaerin F215G and plated onto VCAM-1-coated slides mounted on a 37°C plate and analyzed by confocal microscopy. CXCL12 (200 ng/ml) was added after the first frame and images are shown at the indicated times to illustrate cell spreading. Time-lapse confocal recording is shown in Movie 5 in supplementary material. (C) Jurkat T cells transfected with the indicated plasmids were sorted and GFP-positive cells were tested for CXCL12-induced adhesion to sVCAM-1 as in Fig. 5. Data represent the mean ± s.d. of two independent experiments performed in triplicate. Bar, 5 μm.

more sensitive to CXCL12-dependent PLC activation. To evaluate the role of PLCβ-induced Ca^{2+} elevation in this migratory response, we treated the cells with the Ca^{2+} chelator EGTA before the chemotactic assay. Ca^{2+} chelators did not

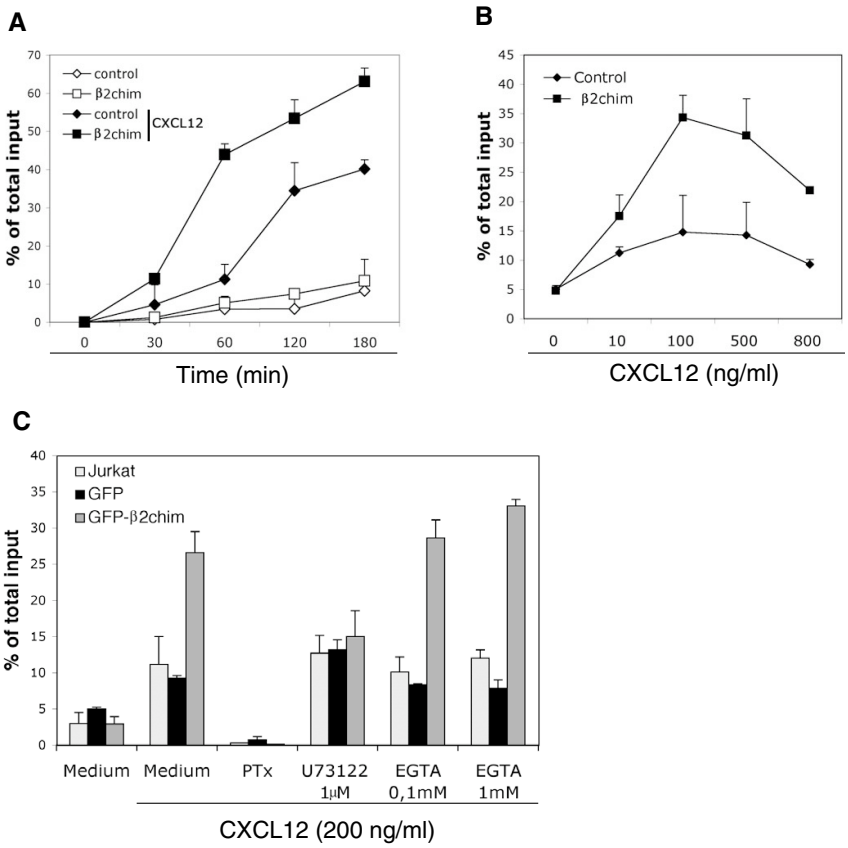


Fig. 9. GFP-β2-chimaerin expression enhances CXCL12-dependent migration of Jurkat T cells. (A) The chemotactic response of parental (control) and GFP-β2-chimaerin cells towards CXCL12 (200 ng/ml) was determined in a 5-μm-pore chemotaxis chamber (see Materials and Methods). Data are expressed as a percentage of input cells, and are shown as the mean ± s.d. of at least three independent experiments. (B) Chemotactic responses of parental (control) and GFP-β2-chimaerin-expressing cells towards CXCL12 at the concentrations indicated were determined at 1 hour post-stimulation. Data are expressed as in A, showing the mean ± s.d. of at least three independent experiments. (C) The chemotactic response of parental, GFP- and GFP-β2-chimaerin-expressing cells towards CXCL12 (200 ng/ml) was determined 1 hour post-stimulation. Before seeding into the chamber, cells were incubated with the indicated concentrations of U73122 or EGTA (30 minutes) or with PTx (100 ng/ml) overnight at 37°C. Data are expressed as in (A), and are shown as the mean ± s.d. of at least three independent experiments.

reduce migration of β2-chimaerin-expressing cells, suggesting that this is a DAG-mediated effect (Fig. 9C). Together, these results suggest that the enhanced CXCL12-induced migration of GFP-β2-chimaerin-expressing cells responds to DAG generation mediated by PLC activation through a $G\alpha_i$-dependent mechanism.

Discussion

The identification of non-PKC types of DAG-binding proteins has provided new functions for this lipid messenger in the regulation of cell responses. In mammals, there are five alternative non-PKC families of DAG/PE target proteins: protein kinase D (PKD), diacylglycerol kinases (DGK) β and γ, Ras guanyl nucleotide-releasing proteins (RasGRP), chimaerins and mammalian uncoordinated 13 (Munc13). Non-PKC DAG-binding proteins are reported to be essential for T-cell functions: RasGRP1, a DAG-modulated GEF for Ras, is required for positive selection in the thymus and correct homeostasis of mature T cells (Ebinu et al., 1988; Priatel et al., 2002); recent experiments in genetically modified animals also revealed that PKD exerts important and divergent effects in T-cell differentiation (Marklund et al., 2003). The existence of distinct families of DAG-receptors in T lymphocytes reinforces the essential role of PLC-dependent DAG generation in the regulation of T-cell responses, increasing the complex network of DAG-modulated signals in this particular cell type. Chimaerins were the first high-affinity non-PKC DAG-binding proteins discovered, although endogenous mRNA expression had been reported only in the nervous system. In the present study we demonstrate for the first time endogenous chimaerin expression in T cells, and provide evidence of its role as a direct modulator of CXCL12-dependent adhesion and migration of T lymphocytes.

Here we show that β2-chimaerin expression in T cells reduces CXCL12-induced Rac activation and concomitantly diminishes CXCL12-induced α4β1-mediated cell spreading and adhesion to immobilized VCAM-1. This effect is lost in cells expressing β2-chimaerin GAP-inactive form. These experiments demonstrate that GAP activity is essential for β2-chimaerin biological activity in T lymphocytes, at difference from the suggested requirements for α2-chimaerin function (Hall et al., 2001). Whereas adhesion in most cell types depends strictly on Rac activation, the exact mechanism that governs chemokine-induced adhesion of T lymphocytes is a question of active debate. Several reports have shown that chemokines upregulate integrin-dependent adhesion by PI3K-independent mechanisms, questioning the relevance of Rac activation in regulating this process. Our results showing the potent effect of β2 chimaerin expression on CXCL12-dependent cell spreading and adhesion to VCAM-1 throw new

light on the essential role of Rac in the regulation of this process. Similar effects to those described for Jurkat T cells are observed in primary lymphocytes, confirming that they are not specific for this particular cell line. Moreover, the lack of effect in cells expressing a β2-chimaerin mutant defective for DAG binding indicates the essential role of this lipid for correct β2-chimaerin function. DAG-dependent modulation of Rac-GTP levels thus represents another example of the broad regulatory role of DAG in the regulation of lymphocyte responses.

Discrimination of DAG-dependent signals by distinct types of DAG-binding proteins represents a complex biological problem. Our studies using GFP-tagged proteins expressed in living lymphocytes provide some clues for the specific regulation of this particular DAG receptor. PMA addition to intact lymphocytes induces translocation to the membrane of the GFP-fused β2-chimaerin C1 domain: a domain shown to bind PMA with high affinity in vitro (Caloca et al., 1997). Membrane localization of the full-length GFP-β2-chimaerin in living T cells, nonetheless, requires higher PMA doses than those needed for membrane localization of other C1-containing proteins such as PKCθ, RasGRP1 or even its own isolated C1. The crystal structure of β2-chimaerin reveals that, in the inactive state, the N-terminal domain maintains a 'closed' conformation through intramolecular interactions, sterically blocking Rac binding and concealing the C1 domain in the absence of additional stimuli (Canagarajah et al., 2004). Accordingly, mutations to residues reported as responsible for maintaining the C1 domain hidden and not readily available to DAG/PMA-binding (Q32 and I130) render a protein that responds to PMA stimulation as efficiently as the isolated β2-chimaerin C1 domain. These results in living T lymphocytes fully support the structural data and suggest a model where β2-chimaerin would exist in equilibrium between an open/membrane-associated and closed/cytosolic conformation. Membrane localization would be favored by RacGAP-domain-dependent binding to Rac and C1-mediated DAG/PMA interaction. Accordingly, our experiments demonstrate that PMA-dependent translocation of GFP-β2-chimaerin is more effective in cells expressing constitutive active Rac. In addition, GFP-β2-chimaerin translocation, observed at higher PMA concentration, could be the result of PMA-dependent displacement of this equilibrium to the β2-chimaerin membrane-bound form. This cooperation between DAG/PMA binding and active Rac, as a result of the domain combination present only in the chimaerin family, would provide a mechanism for discriminating among distinct DAG-dependent cellular signals. This type of mechanism would also ensure a feedback regulation mode in which β2-chimaerin relocates to membranes, stimulating Rac-GTP hydrolysis, in response to Rac-GTP levels.

Although the β2-chimaerin-occluded C1 domain is relatively inefficient for protein translocation, our results demonstrate that a mutation that impairs its membrane binding, fully prevents the β2-chimaerin effect on CXCL12-dependent responses. These data, again in agreement with the crystal structure, suggest that the C1 domain is essential for β2-chimaerin Rac-GAP function, probably disrupting the steric inhibition on the Rac-binding site.

Further experiments should help to clarify the sequence of events responsible for β2-chimaerin transition from a closed to an open/active conformation. Type 2 chimaerins contain an 'atypical' N-terminal SH2 domain, highly conserved in α and β isoforms, which includes a Glu residue replacement of the invariant Trp in the N-terminus of the 'classical' SH2 domains (Hall et al., 1993; Leung et al., 1994). This suggests that the β2-chimaerin SH2 domain may not bind to tyrosine-phosphorylated residues in other proteins. Accordingly, our preliminary studies did not detect association of β2-chimaerin with tyrosine-phosphorylated proteins following CXCL12 stimulation. A role for the SH2 domain maintaining the inactive conformation of chimaerins would explain previous studies in neuroblastoma cells showing the distinct functional effects and subcellular localization of α1 and α2 chimaerin isoforms (Hall et al., 2001).

Whereas β2-chimaerin-expressing cells showed a marked decreased in CXCL12-induced spreading and adhesion to immobilized integrins, they migrated more efficiently in response to the chemokine. CXCL12-mediated migration of β2-chimaerin-expressing cells was PTx-sensitive, as was the case for parental cells, indicating CXCR4/Gα_i protein-mediated signaling. The migratory advantage of β2-chimaerin-expressing cells was very sensitive to inhibition of PLC activity, even at inhibitor concentrations that did not affect parental cell migration. As modulation of Ca^{2+} elevation did not affect cell migration, our results show that the β2-chimaerin-enhanced effect on cell migration depends directly on CXCL12-induced DAG elevation by a Gα_i-coupled PLC-dependent mechanism.

Chemokine binding to its receptor triggers a series of signaling events that result in directional cell migration toward the chemoattractant source. The migrating cell is characterized by an actin-rich membrane protrusion at the leading edge and a tail structure at the trailing edge. This morphologic polarization involves dynamic actin polymerization at the cell front and actin disassembly behind the leading edge, as well as cell body contraction and retraction of the trailing edge (Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999). The signaling events that regulate directional migration have been studied thoroughly. The front edge requires high Rac activity that promotes assembly of F-actin networks, whereas Rho activity and actomyosin array assembly are crucial at the trailing edge (Xu et al., 2003). The activities of Rho and Rac negatively regulate one another; Rho activity at the trailing edge inhibits protrusive lamellipodium formation at this site, promoting the development of a single leading edge (Worthylake and Burridge, 2003.). In addition, during migration, actin cytoskeletal remodeling must be coordinated with cycles of integrin-mediated cell-substratum attachment at the leading edge and detachment at the trailing edge. RhoA and Rho-kinase promote migration in Jurkat T cells and neutrophils by inhibiting actin cytoskeleton-dependent cell adhesion and integrin activation outside the leading edge (De La Roche et al., 2002; Worthylake and Burridge, 2003). This dynamic antagonism between Rac and Rho signaling pathways maintains cell polarization and allows directional responsiveness to the chemoattractant. The spatial and temporal activation of these two proteins, and therefore their GEFs and GAPs, requires precise regulation. Our results suggest a model in which β2-chimaerin-dependent downmodulation of Rac in response to DAG elevation could be implicated in maintaining the dynamic equilibrium between 'front' and 'back' signals, thus enhancing the migratory

response. PLCβ is proposed to be stimulated by active Rac (Snyder et al., 2003.); this suggests a negative-feedback loop in which Rac-dependent PLC activation induces elevation of DAG levels, leading to β2-chimaerin activation and subsequent downregulation of Rac activity behind the leading edge.

In conclusion, our findings demonstrate for the first time a functional role for ectopically expressed β2-chimaerin in the regulation of chemokine-modulated responses in T lymphocytes. The spatial restriction imposed by the C1 domain allows strict regulation of the β2-chimaerin Rac-GTPase-activating function, which acts as a positive modulator of polarized migration while reducing chemokine-induced integrin adhesion. Additional experiments aimed to knock down endogenous protein will help to provide further insight into the physiological relevance of β2-chimaerin in the regulation of T-cell functions.

Materials and Methods

Reagents and antibodies

Orthovanadate, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), poly-DL-lysine, paraformaldehyde (PFA), Igepal CA-630 (NP40), human fibronectin, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), EGTA and pertussis toxin (PTx) were from Sigma (St. Louis, MO). Leupeptin and aprotinin were purchased from Roche (Basel, Switzerland). CXCL12 was from Peprotech (London, UK), U73122 from Calbiochem (San Diego, CA) and recombinant human VCAM-1/Fc chimera from R&D Systems (Minneapolis, MN). BODIPY TR ceramide, Rhodamine-phalloidin and BCECF-AM [2′,7′-bis(carboxyethyl)-5(6′)-carboxyfluorescein-acetoxymethyl ester] were from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands). The anti-β2-chimaerin monoclonal antibody (mAb) was generated as described (Wang and Kazanietz, 2002). Anti α-tubulin was from Sigma (St. Louis, MO) and anti-Rac1 from BD Transduction Laboratories (Lexington, KY). The anti-CXCR4-01 mAb was generated as described (Vila-Coro et al., 1999). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse and anti-rat IgG were from Dako (Glostrup, Denmark). The HP1/2 anti-α4 mAb was a gift from F. Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, Spain). Mouse monoclonal anti-EE Ig were kindly provided by P. Hawkins (Babraham Institute, Cambridge).

RT-PCR

RNA was prepared from Jurkat cells using the guanidinium-isothiocyanate acid phenol method. First-strand cDNA synthesis was done using random primers. PCR was performed with primers 5′-TGCTGAAGAATACCAGCCTC-3′ and 5′-TTGGAATAGGTATCATATGTG-3′.

Recombinant plasmids

Generation of plasmid encoding EGFP-β2-chimaerin wt and ΔEIE mutant have been described (Caloca et al., 1999; Caloca et al., 2003). For T-lymphocyte transfection, β2-chimaerin cDNA was excised from CMV plasmids and subcloned at the EGFP C-terminus of the pEFbosEGFP vector modified from pEGFP (Clontech) as described (Sanjuan et al., 2001). The GFP-fused construct of β2-chimaerin C1 domain was generated as described (Carrasco and Merida, 2004). The β2-chimaerin F215G mutant was generated by site-directed mutagenesis using the QuikChange mutagenesis kit from Stratagene (La Jolla, CA). We used pEFbosEGFP-β2-chimaerin as a template, and generated the replacement of Phe215 by Gly with the primer 5′-GAGAAGACACACAACGGTAAGGTCCACACGTTC-3′ (mutated codon underlined). The resulting construct (GFP-β2-chimaerin-F215G) was confirmed by sequencing. EGFP-β2-chimaerin Q32A and I130A mutants were previously described (Canagarajah et al., 2004). Plasmids encoding α-chimaerins, used as RT-PCR controls, were a kind gift of C. Hall (Institute of Neurology, London, UK). Plasmids encoding constitutive active (RacV12) and dominant-negative (RacN17) plasmids in-frame with the N-terminal EE-tag epitope were a generous gift of P. Hawkins (The Babraham Institute, Cambridge, UK). Plasmid encoding RacN17 in-frame with EGFP was a gift of F. Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, Spain). GST-RBD Pak was a gift of A. Berns (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands).

Cell culture and transfection

Human leukemia and lymphoma cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Jurkat and Molt-4 are cell lines derived from acute T-cell leukemias; Karpas 299 and SUDHL-1 were derived from anaplastic large cell lymphomas (ALCL), which have the t(2;5)(p23;q35) translocation, resulting in the NPM-ALK fusion gene. HDLM2 is a Hodgkin/Reed-Sternberg (H-RS) cell line of T-lymphocyte origin. Toledo was derived from a non-Hodgkin's B-cell lymphoma. HT cells were derived from a human B-cell lymphoma, and Namalwa from a Burkitt's lymphoma. Jurkat cells were cultured in DMEM (BioWhittaker, Walkersville, MD) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma), 2 mM glutamine, 10 mM HEPES, and 100 U/ml each penicillin and streptomycin. The remaining cell lines were maintained in RPMI 1640 (BioWhittaker) supplemented as for Jurkat cells. Cells in logarithmic growth phase were transfected (1.2×10^7 in 400 μl complete medium) with 20 μg plasmid DNA by electroporation in a Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules CA; 270V, 975 μF). Cells were immediately transferred to 10 ml complete medium and assayed after 24 hours. To generate stable GFP-β2-chimaerin transfectants, Jurkat cells were transfected and sorted to obtain GFP-positive cells (Altra Hypersort, Beckman-Coulter, Miami, FL). Stably transfected populations were maintained in G418 selection medium.

HEK293 cells were maintained in DMEM medium supplemented as for Jurkat cells. Cells were transfected using jetPEI reagent (Polyplus transfection SAS, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions and assayed 24 hours later.

Human peripheral blood mononuclear cells were prepared from buffy coats using a Ficoll density gradient. T lymphocytes were isolated by negative selection using anti-CD14-conjugated microbeads and MACS separation columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) to eliminate monocytes, followed by additional negative selection with Dynabeads conjugated with anti-CD19 (Dynal ASA, Oslo, Norway) to remove B lymphocytes. Purity was >95% for each sample, as analyzed by flow cytometry using the T3b anti-CD3 mAb. For nucleofection, isolated human T lymphocytes were washed with PBS/EDTA 0.3 mM and resuspended in T-cell Nucleofector solution at 5×10^6 cells/100 μl. Cells were nucleofected with 5 μg plasmid DNA using an Amaxa Nucleofector (Amaxa, Cologne, Germany). After transfection, cells were transferred immediately to complete medium and assayed after 6 hours. GFP expression by transfected cells was analyzed by flow cytometry.

Western blotting

Cells were lysed in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na_3VO_4, 1% Nonidet P-40, 1 mM PMSF and 10 μg/ml each aprotinin and leupeptin) for 15 minutes on ice. After centrifugation (15,000 ***g***, 15 minutes, 4°C), supernatants were assayed for total protein (DC protein assay, Bio-Rad). Equivalent amounts of proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech). Membranes were blocked, and blots subsequently developed with the indicated antibodies and HRP-conjugated anti-rat or anti-mouse antibodies using the ECL detection kit (ECL; Amersham Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's protocols.

Rac activation assay

A pull-down assay was used to isolate Rac-GTP by binding to the RBD (Rac-binding domain) of PAK-1 (Benard et al., 1999). Jurkat T cells attached to fibronectin-coated plates (10 μg/ml) or HEK293 cells transfected and stimulated as indicated in the figure legends, were lysed in a buffer containing 10% glycerol, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM $MgCl_2$ and protein inhibitors. Lysates were incubated with a GST fusion protein of RBD-PAK-1 in the presence of glutathione-Sepharose 4B beads (1 hour, 4°C). After extensive washing, bound proteins were eluted in loading buffer. PAK-GST-associated Rac was detected with an anti-Rac1 mAb; 30 μg lysate was probed with the same antibody to detect total Rac.

Chemotaxis assay

Parental or stably transfected Jurkat T cells (5×10^5 in 0.1 ml complete medium) were placed in the upper well of 5-μm-pore Transwells (Costar, Cambridge, MA). The lower well contained 500 μl complete medium alone or with CXCL12 (200 ng/ml or as indicated). Plates were incubated (37°C) for the times indicated, and cells that migrated to the bottom chamber were counted on a flow cytometer for 30 seconds. Cell migration was calculated as a percentage of input cells. For drug treatment, before the chemotaxis assay cells were incubated in complete medium with U73122 (1-5 μM) or EGTA (0.1-1 mM) at 37°C for 30 minutes or with PTx (100 ng/ml; 37°C, overnight).

Adhesion assays

Jurkat T cells were transfected with the GFP-fused constructs and sorted 24 hours later to recover GFP-positive cells. Plates (96-well, high binding; Costar, Cambridge MA) were coated with soluble recombinant human VCAM-1 consisting of domains 1-4 fused to the Fc portion of IgG1 (Munoz et al., 1996) (sVCAM-1, 0.7 μg/ml), alone or co-immobilized with CXCL12 (650 ng/ml). Before addition to wells, GFP-positive Jurkat cells were labeled with BCECF-AM. Cells were resuspended in adhesion medium (RPMI 1640, 0.5% BSA) and added to wells (6×10^4 cells in 100 μl) in triplicate. After a 15 second centrifugation, plates were incubated (37°C, 2 minutes) and unbound cells were removed by washing with medium. Adhered cells were lysed with 0.1% SDS in PBS and the extent of adhesion quantified in a fluorescence analyzer (Polarstar Galaxy; BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany). Where indicated, labeled cells were stimulated with PMA (100 μg/ml, 37°C, 5 minutes) before addition to wells. For transfected human T lymphocytes, after the adhesion step and washes, bound cells were detached, counted and

analyzed by flow cytometry to determine the percentage of GFP-positive adhered cells.

Confocal microscopy

For immunofluorescent staining, at 24 hours post-transfection with indicated plasmids, cells were transferred to poly-DL-lysine-coated coverslips and allowed to attach for 15 minutes. Where indicated, attached cells were stimulated with PMA (800 ng/ml, 5 minutes). Cells were then fixed with 2% PFA (10 minutes), washed, permeabilized with PBS 0.2% Triton X-100 and stained with the indicated fluorescent marker. We used fluorescent BODIPY TR ceramide for Golgi detection and Rhodamine-phalloidin for F-actin staining according to manufacturer's protocols. For EE-RacV12 detection, cells were stained with an anti-EE IgG followed by anti-mouse IgG coupled to Cy3. Fluorescence was analyzed on a Leica confocal microscope (TCS-NT, Wetzlar, Germany) and images processed using ImageJ software.

For imaging of living cells, at 24 hours post-transfection, cells were suspended in HBSS (HEPES-balanced salt solution) and plated on poly-DL-lysine or human VCAM-1 (1 μg/ml, R&D Systems) coated chamber slides. Slides were mounted on a 37°C plate; PMA or CXCL12 were added at indicated concentrations after the first frame and images captured every 10 seconds.

We thank M. Mellado, J.M. Rodríguez and J. Stein for critical assessment of the manuscript and I. M. group members for helpful discussions, C. Moreno-Ortiz and A. Moreno for flow cytometry and sorting, and C. Mark for excellent editorial assistance. This work was supported by grants BFU2004-01756 from the Spanish Ministry of Science, GR/SAL/0655/2004 from the Madrid regional government and G03/179 from the Ministry of Health. M. S. and S. C. are fellows of the Spanish Ministry of Education; E. D. is a fellow of the Spanish Ministry of Science. The DIO was founded and is supported by the Spanish Council for Scientific Research (CSIC) and by Pfizer. The authors declare that they have no competing financial interests.

References

Ahmed, S., Lee, J., Wen, L. P., Zhao, Z., Ho, J., Best, A., Kozma, R. and Lim, L. (1994). Breakpoint cluster region gene product-related domain of n-chimaerin. Discrimination between Rac-binding and GTPase-activating residues by mutational analysis. *J. Biol. Chem.* **269**, 17642-17648.

Benard, V., Bohl, B. P. and Bokoch, G. M. (1999). Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J. Biol. Chem.* **274**, 13198-13204.

Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J. and Springer, T. A. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* **382**, 829-833.

Brose, N., Betz, A. and Wegmeyer, H. (2004). Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 329-340.

Caloca, M. J., Fernandez, N., Lewin, N. E., Ching, D., Modali, R., Blumberg, P. M. and Kazanietz, M. G. (1997). Beta2-chimaerin is a high affinity receptor for the phorbol ester tumor promoters. *J. Biol. Chem.* **272**, 26488-26496.

Caloca, M. J., Garcia-Bermejo, M. L., Blumberg, P. M., Lewin, N. E., Kremmer, E., Mischak, H., Wang, S., Nacro, K., Bienfait, B., Marquez, V. E. et al. (1999). beta2-chimaerin is a novel target for diacylglycerol: binding properties and changes in subcellular localization mediated by ligand binding to its C1 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11854-11859.

Caloca, M. J., Wang, H., Delemos, A., Wang, S. and Kazanietz, M. G. (2001). Phorbol esters and related analogs regulate the subcellular localization of beta 2-chimaerin, a non-protein kinase C phorbol ester receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 8303-8312.

Caloca, M. J., Wang, H. and Kazanietz, M. G. (2003). Characterization of the Rac-GAP (Rac-GTPase-activating protein) activity of beta2-chimaerin, a 'non-protein kinase C' phorbol ester receptor. *Biochem. J.* **375**, 313-321.

Canagarajah, B., Leskow, F. C., Ho, J. Y., Mischak, H., Saidi, L. F., Kazanietz, M. G. and Hurley, J. H. (2004). Structural Mechanism for Lipid Activation of the Rac-Specific GAP, beta2-Chimaerin. *Cell* **119**, 407-418.

Carrasco, S. and Merida, I. (2004). Diacylglycerol-dependent binding recruits PKCtheta and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2932-2942.

De La Roche, M. A., Smith, J. L., Rico, M., Carrasco, S., Merida, I., Licate, L. S., Cote, G. P. and Egelhoff, T. T. (2002). *Dictyostelium discoideum* has a single diacylglycerol kinase gene with similarity to mammalian theta isoforms. *Biochem. J.* **368**, 809-815.

Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M. D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L. and Hall, A. (1991). Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* **351**, 400-402.

D'Souza-Schorey, C., Boettner, B. and Van Aelst, L. (1998). Rac regulates integrin-mediated spreading and increased adhesion of T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3936-3946.

Ebinu, J. O., Bottorff, D. A., Chan, E. Y., Stang, S. L., Dunn, R. J. and Stone, J. C. (1988). RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* **280**, 1082-1086.

Feigelson, S., Grabovsky, V., Winter, E., Chen, L. L., Pepinsky, R. B., Yednock, T., Yablonski, D., Lobb, R. and Alon, R. (2001). The Src kinase p56(lck) up-regulates VLA-4 integrin affinity. Implications for rapid spontaneous and chemokine-triggered T cell adhesion to VCAM-1 and fibronectin. *J. Biol. Chem.* **276**, 13891-13901.

Grabovsky, V., Feigelson, S., Chen, C., Bleijs, D. A., Peled, A., Cinamon, G., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., Lapidot, T., van Kooyk, Y. et al. (2000). Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J. Exp. Med.* **192**, 495-506.

Hall, C., Monfries, C., Smith, P., Lim, H. H., Kozma, R., Ahmed, S., Vanniasingham, V., Leung, T. and Lim, L. (1990). Novel human brain cDNA encoding a 34,000 Mr protein n-chimaerin, related to both the regulatory domain of protein kinase C and BCR, the product of the breakpoint cluster region gene. *J. Mol. Biol.* **211**, 11-16.

Hall, C., Sin, W., Teo, M., Mchael, G. J., Smith, P., Dong, J. M., Lim, H. H., Manser, E., Spurr, N. K., Jones, T. A. et al. (1993). Alpha2-chimaerin, an SH2-containing GTPase-activating protein for the ras-related protein p21rac derived by alternate splicing of the human N-chimaerin gene, is selectively expressed in brain regions and testis. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4986-4998.

Hall, C., Michael, G. J., Cann, N., Ferrari, G., Teo, M., Jacobs, T., Monfries, C. and Lim, L. (2001). alpha-2 chimaerin, a Cdc42/Rac1 regulator, is selectively expressed in the rat embryonic nervous system and is involved in neuritogenesis in N1E-115 neuroblastoma cells. *J. Neurosci.* **21**, 5191-5202.

Hurley, J. H. and Meyer, T. (2001). Subcellular targeting by membrane lipids. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 146-152.

Kazanietz, M. G. (2002). Novel "nonkinase" phorbol ester receptors:the C1 domain connection. *Mol. Pharmacol.* **61**, 759-767.

Kazanietz, M. G., Wang, S., Milne, G. W., Lewin, N. E., Liu, H. L. and Blumberg, P. M. (1995). Residues in the second cysteine-rich region of protein kinase C delta relevant to phorbol ester binding as revealed by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 21852-21859.

Kucia, M., Jankowski, K., Reca, R., Wysoczynski, M., Bandura, L., Allendorf, D. J., Zhang, J., Ratajczak, J. and Ratajczak, M. Z. (2004). CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J. Mol. Histol.* **35**, 233-245.

Leung, T., How, B. E., Manser, E. and Lim, L. (1993). Germ cell beta-chimaerin, a new GTPase-activating protein for p21rac, is specifically expressed during the acrosomal assembly stage in rat testis. *J. Biol. Chem.* **268**, 3813-3816.

Leung, T., How, B. E., Manser, E. and Lim, L. (1994). Cerebellar beta 2-chimaerin, a GTPase-activating protein for p21 ras-related rac is specifically expressed in granule cells and has a unique N-terminal SH2 domain. *J. Biol. Chem.* **269**, 12888-12892.

Li, Z., Jiang, H., Xie, W., Zhang, Z., Smrcka, A. V. and Wu, D. (2000). Roles of PLC-beta2 and –beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* **287**, 1046-1049.

Lim, H. H., Michael, G. J., Smith, P., Lim, L. and Hall, C. (1992). Developmental regulation and neuronal expression of the mRNA of rat n-chimaerin, a p21rac GAP:cDNA sequence. *Biochem. J.* **287**, 415-422.

Marklund, U., Lightfoot, K. and Cantrell, D. (2003). Intracellular location and cell context-dependent function of protein kinase D. *Immunity* **19**, 491-501.

Munoz, M., Serrador, J., Sanchez-Madrid, F. and Teixido, J. (1996). A region of the integrin VLA alpha 4 subunit involved in homotypic cell aggregation and in fibronectin but not vascular cell adhesion molecule-1 binding. *J. Biol. Chem.* **271**, 2696-2702.

Nagasawa, T., Kikutani, H. and Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2305-2309.

Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H. and Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* **382**, 635-638.

Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H. and Kishimoto, T. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* **393**, 591-594.

Oberlin, E., Amara, A., Bachelerie, F., Bessia, C., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J. M., Clark-Lewis, I., Legler, D. F. et al. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* **382**, 833-835.

Priatel, J. J., Teh, S. J., Dower, N. A., Stone, J. C. and Teh, H. S. (2002). RasGRP1 transduces low-grade TCR signals which are critical for T cell development, homeostasis, and differentiation. *Immunity* **17**, 617-627.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410.

Sanchez-Madrid, F. and del Pozo, M. A. (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* **18**, 501-511.

Sanjuan, M. A., Jones, D. R., Izquierdo, M. and Merida, I. (2001). Role of Diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling. *J. Cell Biol.* **153**, 207-220.

Smit, M. J., Verdijk, P., van der Raaij-Helmer, E. M., Navis, M., Hensbergen, P. J., R., L. and Tensen, C. P. (2003). CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi- and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. *Blood* **102**, 1959-1965.

Snyder, J. T., Singer, A. U., Wing, M. R., Harden, T. K. and Sondek, J. (2003.). The pleckstrin homology domain of phospholipase C-beta2 as an effector site for Rac. *J. Biol. Chem.* **278**, 21099-21104.

Spiegel, A., Kollet, O., Peled, A., Abel, L., Nagler, A., Bielorai, B., Rechavi, G., Vormoor, J. and Lapidot, T. (2004). Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signaling. *Blood* **103**, 2900-2907.

Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* **81**, 153-190.

Vila-Coro, A. J., Rodriguez-Frade, J. M., Martin De Ana, A., Moreno-Ortiz, M. C., Martinez-A, C. and Mellado, M. (1999). The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J.* **13**, 1699-1710.

Wang, H. and Kazanietz, M. G. (2002). Chimaerins, novel non-protein kinase C phorbol ester receptors, associate with Tmp21-I (p23): evidence for a novel anchoring mechanism involving the chimaerin C1 domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 4541-4550.

Worthylake, R. A. and Burridge, K. (2003.). RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J. Biol. Chem.* **278**, 13578-13584.

Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T. and Bourne, H. R. (2003). Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* **114**, 201-214.

AGRADECIMIENTOS

A Isabel, por su apoyo y confianza, por ver la banda que tú has descartado, por mantener el ánimo y sobre todo por enseñarnos a pensar.

A todos los compañeros del grupo, especialmente a Ángel por enseñarme tantas cosas, a Alicia porque a su lado se respira tranquilidad y se aprecian nuevas perspectivas, a Ernesto M. por cuidar de todos nosotros, a M. Angeles por su sentido del humor, a Esther por su alegría y por ser una currante, a María S. por su ideas y su apoyo y a Teresa por ser una gran amiga y enseñarme a guardar la ropa al mismo tiempo que nadar.

A todas las personas que a lo largo de este tiempo han sido un ejemplo para mí, a Claro R. por su carisma, a Esther B por traernos el calor del Sur en el día a día, a Eli por su energía, a Giovanna por sus "bello", a Maria N. porque todavía hoy recuerdo su risa, a Marta B. por su candidez, a Nadia por su capacidad de trabajo, a Clara por su alegría y capacidad de adaptación, a Conchi por su sensatez, a Mirian M. por su sonrisa, a Luis por ser incansable, a Belén por iniciar las charlas de Ciencia y a Bea por su amistad.

Tampoco me quiero olvidar de Mireia, por su compañía durante las comidas, de Sonia, por su dulzura, de Rosario, por nuestras charlas de "cante", de Antonio, por facilitarme las cosas, de Anabel, por estar siempre dispuesta a echar una mano, de Luis Miguel, por ayudarnos con los transgénicos, de nuestras chicas de cocina: M. Sol, Ana, Megos, Carolina, Reme, Noriar y María por ayudarnos, del servicio

de genómica, del antiguo servicio de secuenciación, especialmente de Ruth por soportar la avalancha de clones de doble híbrido, de M: Carmen y Ana por su ayuda con la citometría, de Celia, por mantener en orden el laboratorio, de Coty, Coral y María, por ayudarnos y de Jesús, Fernando y Juan por su paciencia a horas intempestivas con la verja del CNB.

Muchas gracias a mi segundo hogar en el CNB, los laboratorios de Juan y Amelia porque siempre me he sentido como en casa y especialmente a Patricia por su energía vital. Gracias también a mis amigas Elena, Sole y Patricia.

Gracias a todos los que a lo largo de estos años, han preguntado con una sonrisa, "¿qué tal va eso?"

A mis compis de carrera Iso, Charo y Adela

A mis compis de segundo ciclo: Ana, Gabi, Fernando y especialmente a Alicia por sus "juapa" y por estar siempre pendiente, a Sara por ser tan cariñosa, a José por tantas y tantas cosas pero sobre todo por ayudarme a superar mis dudas y no sólo de Ciencia y a Eva por pasar de ser una compañera a una amiga inseparable y sobre todo por cuidar de mí.

A Nbe, Moni, Paloma y Alcides por compartir buenos recuerdos de la infancia y la adolescencia y a Marisa porque quizá sea la principal responsable de que haya llegado hasta aquí.

A Agustín por darme una oportunidad en mis comienzos y a Juanjo y a Eva por su amistad.

A Lope y Consuelo por su paciencia y por hacer realidad un sueño que ni siquiera sabía que tenía.

A Ricardo, Rosa, Rafael y María por todos nuestros buenos ratos

A mi segunda familia: Tino, Adelina, Marto, Miguel, Carmen y Rubén por tantos maravillosos veranos.

A mi familia, Mamia, Javi, Mycie, Yumi, Ire, Carlos, Mari, Eladio, Elena, Mich, Mateo, Nico, Jeffrey, Antonio, Luci, Vir, Alberto, Lucia, Fran, Estrella, Arturo, Araceli, Emilio, Pascuala y Eustaquio; especialmente a mis padres por enseñarnos a ser constantes y trabajadores con su ejemplo del día a día y por poner todo su esfuerzo en enseñarnos a ser buena gente y a mi abuelo por ser su "nenina".

A Juanje, por su genialidad inagotable, por su ternura y por "hacerme volar".

Madrid, Diciembre 2005

Silvic